АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVIII. ВЫП. 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1949

МИКРОБИОЛОГИЯ

Главный редактор академик Б. Л. Исаченко

Зам. главного редактора чл.-корр. Академии Наук СССР
А. А. Имшенецкий

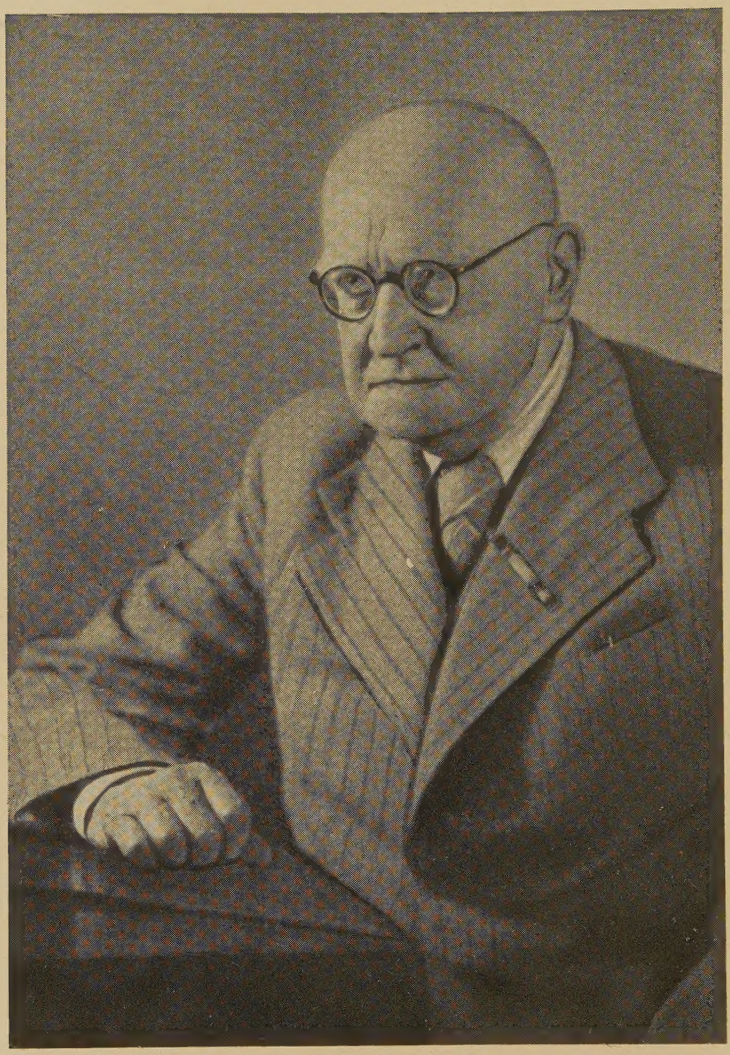
Секретарь Я. И. Раутенштейн

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Н. Д. Иерусалимский, Н. А. Красильников, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ „МИКРОБИОЛОГИЯ" ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА „АКАДЕМКНИГА".

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакция журнала «Микробиология»



Н. Ф. ГАМАЛЕЯ

НИКОЛАЙ ФЕДОРОВИЧ ГАМАЛЕЯ

(К девяностолетию со дня рождения)

17 февраля текущего года исполнилось 90 лет со дня рождения одного из основателей нашей отечественной микробиологии, почетного академика Николая Федоровича Гамалея.

Начало научной деятельности Н. Ф. Гамалея восходит к славной эпохе И. И. Мечникова и Луи Пастера, когда строился самый фундамент науки о микробах. Н. Ф. Гамалея — современник, ученик и соратник этих великих исследователей. Он был первым сотрудником организованной И. И. Мечниковым микробиологической лаборатории в Одессе. В этом же городе Н. Ф. Гамалея организует первую в нашей стране станцию по прививкам против бешенства. После созданной в Париже Пастером эта станция, организованная Николаем Федоровичем, является старейшей в мире.

Трудно в небольшой статье рассмотреть все обширное и разнообразное содержание работ Николая Федоровича. Ему принадлежат капитальные исследования по целому ряду наиболее опасных эпидемических заболеваний. Назовем среди них: «Чума в Одессе» (1903—1904), «Холера и меры борьбы с нею» (1905), «Оспа и оспопрививание» (1925). Н. Ф. Гамалея удалось выяснить пути распространения этих инфекций в условиях царской России, и, несомненно, труды Н. Ф. Гамалея сыграли существенную роль в том, что в нашей стране в настоящее время эти заболевания совершенно отсутствуют. Достаточно широко деятельность этого старейшего из микробиологов смогла развиться только после Великой Октябрьской социалистической революции. Уже в 1917 г. по его инициативе было введено обязательное оспопрививание в Петрограде и в Северо-Западной Коммуне и организовано снабжение детритом Красной Армии. Во всех своих последующих научных и научно-практических мероприятиях Н. Ф. Гамалея неизменно встречал всяческую поддержку со стороны советского правительства.

Заслуги Н. Ф. Гамалея значительны не только в области медицинской, но также и в области общей микробиологии.

Его работы по изменчивости микробов являются одними из первых опытов экспериментального получения измененных форм микробов. В своих исследованиях по изменчивости микроорганизмов Николай Федорович Гамалея опирается на выдающееся учение великого преобразователя природы — И. В. Мичурина.

К реакционному менделевско-морганистскому направлению в биологии Н. Ф. относился враждебно, как к лженаучному. В последние годы Николай Федорович и ближайшие его сотрудники особое внимание уделяют разработке проблемы направленного изменения наследственных свойств микроорганизмов.

Классическими следует признать многочисленные исследования Н. Ф. Гамалея, посвященные изучению литических процессов у бактерий. Следует отметить, что именно Николай Федорович первый открыл явления бактериофагии и пытался химическими методами выделить агент, вызывающий лизис у бактерий, предвосхитив тем самым все работы по очистке бактериофага химическим путем. Бесспорно,

Н. Ф. Гамалея был пионером в области изучения ферментативной природы литических процессов бактериальной клетки. Книга Н. Ф. Гамалея «Биологические процессы разрушения бактерий» (1934) отличается богатством мыслей и интересным объяснением механизмов лизиса и антагонистических взаимоотношений между различными микробами, микробами и тканями животных и т. д. В настоящее время, когда антибиотические вещества микроорганизмов стали предметом интенсивного изучения, эта работа Н. Ф. Гамалея заслуживает особого внимания.

В своей разносторонней деятельности Н. Ф. Гамалея неоднократно возвращается к проблеме фильтрующихся вирусов. Уже в 1886 г. он показал, что возбудитель чумы рогатого скота проходит через бактериальные фильтры. Интересны его работы по инфекционной анемии лошадей. Его содержательная книга «Фильтрующиеся вирусы» (1930) существенно способствовала распространению знаний в этой области. Во время Отечественной войны вышла его книга «Грипп и меры борьбы с ним» (1942), в которой широко освещены вопросы эпидемиологии, профилактики и лечения гриппа.

Роль Н. Ф. Гамалея в области подготовки кадров и популяризации микробиологических и санитарно-гигиенических знаний огромна. Его монография «Основы общей бактериологии» в первом издании вышла уже в 1899 г. и, следовательно, вообще является одним из старейших руководств по медицинской микробиологии. К циклу таких же учебных пособий относятся: «Лекции по общей патологии» (1908), «Основы иммунологии» (1928), «Учение об инфекции» (1931), «Инфекция и иммунитет» (1939). Книги и статьи Н. Ф. Гамалея появлялись также на языках народов СССР (украинском, башкирском), многие книги неоднократно переводились на иностранные языки. Большую роль в развитии советской микробиологии сыграл журнал «Гигиена и санитария», который издавал и редактировал Н. Ф. Гамалея с 1910 по 1917 год.

Нельзя без восхищения следить за неугасающей творческой деятельностью Николая Федоровича, который в последние годы опубликовал ряд интересных работ по изменчивости микробов, по специфическому лечению туберкулеза и т. д. Его творческая энергия проявляется также в области популяризации научных знаний, и его статьи мы найдем не только в специальных журналах, но и в массовой прессе. Достаточно отметить, например, его интересный очерк об И. П. Павлове, появившийся в «Пионерской Правде» 3 года назад, чтобы охарактеризовать широту интересов, энергию и преданность задачам просвещения, которые сохранил этот замечательный ученый и патриот на протяжении всей своей жизни.

Книги Н. Ф. Гамалея не только богаты содержанием, полны глубоких мыслей и блестящих сопоставлений, но и написаны очень интересно. У него редкий дар популяризатора, которым обладал К. А. Тимирязев и другие наши выдающиеся ученые и который состоит в умении делать науку для всех интересной и увлекательной. Труд Н. Ф. Гамалея «Воспоминания» является не только ценнейшим материалом для истории микробиологии, но и образцом популяризации.

Николай Федорович Гамалея является пламенным патриотом своей Родины, беззаветно любящим свой народ. Во всей своей многолетней и многогранной деятельности он всегда ставил и ставит интересы своего народа превыше всего. Еще в 1904 г. он в книге «Борьба с заразными болезнями» писал: «Улучшение состояния здоровья народа есть та социальная задача, которая должна быть впереди всех других и которая раньше всех других должна обратить на себя внимание ученых и государственных деятелей».

Вся большая и содержательная жизнь Николая Федоровича посвящена неутомимому служению своему народу, активному участию в

строительстве социализма, претворению в жизнь великих идей коммунизма.

В 1948 г. академик Н. Ф. Гамалея вступил в ряды коммунистической партии. В своем заявлении о приеме в партию Николай Федорович писал: «В период исключительно напряженной борьбы двух систем на идеологическом фронте я хочу быть в партии Ленина — Сталина, чтобы в первых ее рядах бороться за торжество диалектико-материалистических идей, за демократическое преобразование мира против реакционных философствующих идеологий».

Указом Президиума Верховного Совета СССР от 16 февраля 1949 г. почетный академик Н. Ф. Гамалея за выдающиеся заслуги в области микробиологии и борьбы с инфекционными заболеваниями и в связи с 90-летием со дня рождения награжден орденом Ленина. Вся советская общественность горячо поздравляет Николая Федоровича с заслуженной высокой наградой и со славным юбилеем и желает ему доброго здоровья и дальнейших успехов в его плодотворной деятельности на благо нашей родины, во славу самой передовой в мире советской науки.

Редакция

ЛИТИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В КУЛЬТУРАХ ACTINOMYCES GRISEUS[1]

Ц. З. Рогинская и *В. И. Любимов*

Получение стрептомицина для экспериментальных целей производилось нами путем выращивания Act. griseus на плотной питательной агаровой среде (гороховый отвар: 5% гороховой муки + 0,5% поваренной соли), которой покрывалась внутренняя поверхность трехлитровых сосудов. Обычно на 2—3-е сутки вся поверхность агара покрывается сплошным воздушным спороносящим мицелием Act. griseus.

В таких массовых посевах нами наблюдались иногда необычные явления, а именно: вместо сплошного роста в отдельных сосудах вырастали единичные колонии и появлялись участки, совсем не покрытые мицелием. Наконец, поверхность, сплошь покрытая мицелием, оказывалась испещренной пустыми зонами правильной круглой формы от 1 до 10 мм в диаметре. Иногда поверхность приобретала вид сетки. Эти зоны при бактериологическом и бактериоскопическом исследовании оказались стерильными. Вся морфологическая картина указывала на то, что мы имеем дело с явлением лизиса культур.

Выяснению природы литического фактора и посвящено данное исследование. Способен ли литический фактор проходить через бактериальный фильтр?

Для получения ответа на этот вопрос мы поступили следующим образом. В сосуды с таким ненормальным ростом актиномицета наливался физиологический раствор. Агар встряхивался и в течение 20 часов вымачивался в этом растворе. Затем жидкость фильтровалась через фильтр Зейтца и испытывалась на присутствие литического фактора. Испытание производилось следующим образом. Делалось последовательное десятикратное разведение фильтрата в бульоне Хоттингера. Затем из каждого разведения наносилась капля на культуру Act. griseus, предварительно засеянную сплошным газоном на чашке с агаром. Как выяснилось, фильтрат, разведенный в 10^7, вызывал лизис растущей культуры Act. griseus в месте нанесения капли. Так было установлено, что литический фактор проходит через фильтр Зейтца. Фильтрат, выдержанный в течение 7 дней в термостате при 28°, оставался стерильным. Перевивается ли литическое начало? Имея в руках фильтрат, вызывающий лизис Act. griseus, мы могли воспроизводить лизис культуры актиномицета, которая сама по себе не обнаруживала этого явления. Путем многократных последовательных пересевов из стерильных пятен на сплошной посев актиномицета мы убедились в перевиваемости литического фактора. Увеличивается ли титр литического фактора при последовательных пассажах?

Для выяснения этого вопроса фильтрат разводился последовательно десятикратно в бульоне Хоттингера, как обычно делается при титровании фага по Аппельману. Затем в каждую пробирку вносилась культура Act. griseus. Пробирки помещались в термостат при 24—26°. В течение 7 дней каждое разведение ежедневно испытывалось на присутствие литического фактора (табл. 1).

---

[1] Настоящая работа была доложена в Институте микробиологии АН СССР 21 мая 1947 г. Таким образом, она была выполнена ранее и независимо от работы Reilly, Harris и Waksman [6], но не была опубликована по техническим причинам.

Таблица 1

Увеличение титра литического фактора в процессе роста культуры Act. griseus

Возраст культуры	Степень разведения											
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
До посева	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−
Через 24 часа роста	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
» 96 часов »	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
» 5 суток »	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−
» 7 суток »	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−

Если размножение бактериофага в присутствии молодой бактериальной культуры заканчивается в течение 10—12 часов, то в этих опытах размножение литического начала соответствовало скорости развития культуры Act. griseus.

По мере роста Act. griseus увеличивается титр литического фактора. Если до подсева культуры он был равен 10^7, то через 24 часа он уже оказывался равным 10^8 и обычно достигал своего максимума (10^{10}) на 3—4-е сутки, после чего дальнейшее увеличение уже не отмечалось.

Нужно сказать, что в пробирках с литическим фактором споры Act. griseus прорастают очень медленно и не покрывают всей поверхности бульона. Литический фактор, полученный в бульоне, также фильтровался и при последующих пассажах увеличивался в своей лизирующей силе, что свидетельствовало о его способности размножаться и в жидкой среде.

Образование литического фактора наблюдалось также и в погруженных культурах где он достигал титра 10^6, 10^7. При этом стрептомицин или не образовывался, или же появлялся в незначительных количествах (16 ед/мл).

Рис. 1

Литический фактор проявляется при одновременном посеве с Act. griseus. Явление лизиса наблюдается также, если литический фактор нанесен на суточную культуру, когда споры проросли, но воздушный мицелий еще не образовался. Однако, если литический фактор нанести на уже выросший воздушный мицелий, то явлений лизиса не наблюдается. При внесении в суспензию спор Act. griseus фильтрата, разведенного до 10^{-7}—10^{-8}, при последующих высевах на сплошном фоне роста обнаруживаются многочисленные зоны лизиса, указывающие на корпускулярную природу литического фактора (рис. 1).

Число корпускул может быть подсчитано так же, как это делают при определении числа корпускул бактериофага.

Морфологические изменения колоний Act. griseus под влиянием литического начала

Отдельные колонии Act. griseus на агаровой среде, содержащей 1% пептона Хоттингера, 1% глюкозы и 0,5% NaCl, имеют правильные округлые очертания. Через сутки инкубации они имеют хрящеватую консистенцию и слегка желтоватую окраску. Через двое суток колонии равномерно покрываются воздушным спороносящим мицелием белого цвета. Споры в это время снимаются с трудом. На 4—5-е сутки воздушный мицелий становится темнокремовым, и споры уже снимаются легко.

Для массовых посевов мы обычно употребляли маточные культуры в возрасте 5—6 дней.

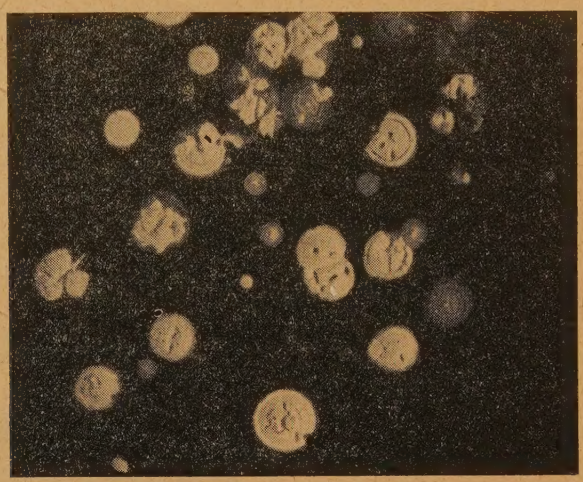


Рис. 2

При высеве на ту же среду спор Act. griseus в смеси с лизирующим фактором вырастали только редкие колонии актиномицета, весьма различные по внешнему виду: с изъеденными краями, с секторами, лишенными воздушного мицелия, или же совершенно лишенные его. От таких колоний впоследствии остается только тень (рис. 2). Отсев от них не дает роста.

Внешний вид подобных колоний напоминает колонии, описанные рядом авторов, как мутанты, сальтанты и т. д. Мы убедились, что эти морфологические изменения формы колоний связаны с присутствием литического начала.

Иногда в зонах лизиса культур Act. griseus появляется вторичный рост в виде отдельных колоний.

Нам удалось из такой колонии выделить культуру Act. griseus, которая оказалась устойчивой к данному литическому фактору и образовывала стрептомицин.

Специфичность действия литического фактора

Испытание литического фактора в отношении Act. lavendulae, Act. violaceus, Act. coelicolor и Proact. albus показало, что он не вызывает лизиса этих организмов. Даже отдельные штаммы Act. griseus оказываются устойчивыми к данной форме литического фактора. Доказательством тому является культура Act. griseus, выделенная нами.

Литический фактор при испытании на бактериях дизентерии Шига и Флекснер, брюшнотифозной палочке и Bact. coli не вызывал их лизиса.

Устойчивость литического фактора к внешним воздействиям

Влияние температуры. Прогревание фильтрата, содержащего литический фактор, при 60, 65, 75 и 80° в течение 10, 20 и 30 минут, не инактивирует его действие. Полной инактивации не наступает даже при 10-минутном нагревании его в кипящей водяной бане. Инактивируется он только кипячением в течение 20—30 минут.

В то же время прогревание спор Act. griseus при 65° в течение 30 минут полностью их убивает. Таким образом, литический фактор более устойчив к нагреванию, чем споры актиномицета.

Ультрафиолетовые лучи. Облучение Act. griseus ультрафиолетовыми лучами (лампа «Hanovia 250» на расстоянии 35 см) в течение более чем 5 секунд приводит к гибели значительное число спор. Вместо массивного сплошного роста вырастают лишь отдельные колонии. Облучение литического фактора при тех же условиях в течение 30 минут не вызывает его инактивации.

Влияние формалина. Обычный продажный 40% формалин, разведенный 1 : 2000, убивает споры Act. griseus за 24 часа.

Литическое начало инактивируется полностью в течение 24 часов только при воздействии формалина, разведенного 1 : 100.

Влияние pH на литический фактор. Взгляд на бактериофаг как на коллоидную мицеллу, имеющую отрицательный заряд, доказан многочисленными исследованиями. Поэтому было интересно выяснить отношение литического фактора Act. griseus к актуальной кислотности среды (pH).

В пробирки, содержащие 5 мл буферных растворов, имевших pH = 2,40—2,99—3,31—4,05—4,57—5,00—7,00—9,00, вносился 1 мл фильтрата, содержащего литический фактор. Через 24 часа во всех пробирках pH доводился до 7,0 и определялась литическая активность фильтрата. Оказалось, что литический фактор сохранялся при pH = 3,0—9,0 и полностью инактивировался при pH = 2,4 (табл. 2).

Испытание устойчивости спор Act. griseus к pH показало, что в одних и тех же условиях они сохраняют свою жизнеспособность. Это дало повод к попытке освобождения таким путем культур Act. griseus от литического фактора.

Таблица 2

Влияние pH на литический фактор

pH	Число корпускул вначале в 1 мл	Число корпускул через 24 часа в 1 мл
2,4	403 333 333	0 000
2,99	403 333 333	240 000
4,05	403 333 333	9 306 000
Контроль (физиол. раствор)	403 333 333	403 000 000

Таблица 3

Влияние pH на литический фактор в смеси со спорами Act. griseus

pH	Число стерильных пятен	Жизнеспособность спор Act. griseus
2,4	0	+
2,99	196	+
3,31	357	+
4,05	Полный лизис	+
4,57	То же	+
Контроль (физиол. раствор)	» »	+

В пробирки с 5 мл гликоколевого буфера (с различным pH) вносились 121 млн. корпускул литического фактора и споры Act. griseus.

Через 24 часа 0,1 мл этой смеси высевалась на поверхность агара в чашке Петри, а через 3 суток подсчитывалось число стерильных пятен.

При такой постановке опыта отмечается полная инактивация литического фактора при pH = 2,4 и частичная инактивация при pH = = 2,99—3,31. Споры Act. griseus даже при pH = 2,4 полностью сохранили свою жизнеспособность (табл. 3).

Таким образом, из всех изученных нами внешних факторов (температура, облучение ультрафиолетовыми лучами, формалин и pH) лишь актуальная кислотность имеет различное влияние на споры Act. griseus и на литический фактор и может быть использована для освобождения от него культур.

Дмитриев [1, 2, 3] наблюдал и описал в ряде статей явление «спонтанного лизиса» в культурах Act. bovis Bostroem. Автор указывал, что этот литический фактор обладает способностью перевиваться и имеет целый ряд черт, сближающих его с феноменом бактериофагии, наблюдающимся у бактерий. В то же время автору не удавалось безупречное воспроизведение феномена перевивающегося лизиса с тем постоянством, как это имеет место для бактериальных культур. Не удалось автору установить и действительное накопление литического начала. Поэтому он не приходит к определенному выводу относительно описанного явления и в заключение указывает: «Возможно также, что здесь имеет место простой ферментативный процесс, связанный с определенным моментом в развитии культуры». В последней своей работе автор по тому же вопросу пишет: «На литические процессы и на процессы диссоциации, наблюдаемые у аэробной формы, следует смотреть как на указывающие на известное патологическое состояние культуры, приобретенное ею, повидимому, в больном организме и выражающееся в известном состоянии нарушения ее метаболизма» [3].

Wieringa и Wiebols [7] наблюдали литические явления в культурах Act. roseus, Act. bovis, Act. farcinicus и Act. scabies. Они предполагали, что эти явления вызываются особым бактериофагом.

Красильников [4, 5], весьма детально изучил культуральную и морфологическую картину автолиза у Act. albicans, Act. chromogenes, Act. flavus и Act. verne, а также у ряда проактиномицетов и микобактерий. Автор указывает на строгую специфичность лизирующего фактора, действие которого ограничивается не только пределами одного вида, но даже определенными культурами.

В отличие от бактериофага наблюдавшийся им литический фактор действовал и на мертвые клетки.

Это явление обнаруживалось в тот момент, когда развитие клеток приостанавливалось. «В обычных условиях роста автолиз начинается в период старения культур». В итоге автор заключает, что «явление лизиса у Actinomycetales есть результат автолиза или самопереваривания клеток».

Выводы

1. Литические явления в культурах Act. griseus, наблюдавшиеся нами в общих чертах, сходны с наблюдениями Дмитриева и Вирига и Вибольс, но, повидимому, отличаются от явлений «автолиза» в старых культурах, описанных Красильниковым.

2. Так как Act. griseus используется для получения лекарственного антибиотического вещества стрептомицина, то практическое значение этого явления очевидно. Культуры, содержащие литический фактор, не могут применяться в производстве. Необходимо найти способы предотвращения появления лизиса и выработать меры борьбы с ним. Одним из рациональных приемов, видимо, является выделение форм, устойчивых к лизису.

Строгая специфичность литического фактора, как мы полагаем, может быть использована при дифференцировке новых культур Act. griseus, выделяемых из естественных источников.

Произведенные нами исследования литического фактора в культурах Act. griseus убеждают нас в том, что он имеет свойства, общие с бактериофагом, а именно: перевиваемость, увеличение титра в пассажах, специфичность и корпускулярное строение.

Таким образом, можно утверждать о существовании в природе фага к актиномицетам.

Центральный институт
эпидемиологии и микробиологии
Министерства здравоохранения СССР
Москва

Получено 29.V.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Дмитриев С. Ф. Явления диссоциации и спонтанного лизиса в культуре актиномицета. Журнал микроб., эпидем. и иммунобиол., XIII, 289, 1934.
2. Дмитриев С. Ф. и Фирюкова М. В. К вопросу о возбудителе истинного актиномикоза у человека. Медицин. паразитол. и паразитарн. болезни, V, 417, 1936.
3. Дмитриев С. Ф. Об этиологии актиномикоза. Медицинск. паразитол. и паразитарн. болезни, VIII, 30, 1939.
4. Красильников Н. А. Явления автолиза у Actinomycetales. Микробиология, VII, 708, 1938.
5. Красильников Н. А. и Кореняко А. И. Явления автолиза у Actinomycetales. II. Влияние внешних факторов на автолиз актиномицетов и проактиномицетов. Микробиология, VII, 829, 1938.
6. Reilly, Harris and Waksman. J. Bact., **54**, 451, 1947.
7. Wieringa R. u. Wiebols. Die Stardappelschurfen der Heterolyse des Schurfparasiet. Tidsh. PlZiekt xhii, No. 9, 1936, реф. Rev. Applied Mycology, 16, 1937.

О МАТЕРИАЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ПРОЦЕССОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И КОНСТРУКТИВНОГО ОБМЕНОВ ВЕЩЕСТВ У БАКТЕРИЙ

В. Н. Шапошников и *В. А. Семенова*

Основоположник современной микробиологии Пастер, изучая маслянокислое, а затем спиртовое брожение, пришел, как известно, к выводу о том, что брожение есть не что иное, как «жизнь без воздуха». Он отметил при этом, что брожение нужно рассматривать как отнятие кислорода от сбраживаемого вещества, которое в силу этого подвергается постепенному разложению.

Несмотря, однако, на громадное теоретическое значение самих фактов, установленных Пастером, вопрос об обязательности разложения веществ при анаэробных брожениях в свете последующих исследований должен быть признан частным случаем, не имеющим общего значения. В настоящее время наряду с брожениями, сопровождающимися разложением (десмолизом) сбраживаемых веществ, как молочнокислое брожение, спиртовое и т. д., нам стали известны процессы анаэробного сбраживания, не сопровождающиеся разрывом углеродной цепи.

В качестве примера может быть приведено сбраживание пропионовокислыми бактериями глицерина, при котором продуктами брожения являются пропионовая и янтарная кислоты.

Так же трудно было бы говорить о разложении муравьиной кислоты при анаэробном развитии Bact. formicum (Omeljanski), при котором муравьиная кислота превращается, с одной стороны, в угольную кислоту, а с другой,— в метан.

Каков бы ни был внутренний механизм этих превращений, они в конце концов являются не чем иным, как результатом сопряженного окисления — восстановления (Kluyver [9]), которое может быть изображено следующим образом:

$$A + \begin{bmatrix} H.OH \\ H.OH \end{bmatrix} + B = (AH_2 + H_2O_2 + B) = AH_2 + BO + H_2O$$

или сокращенно

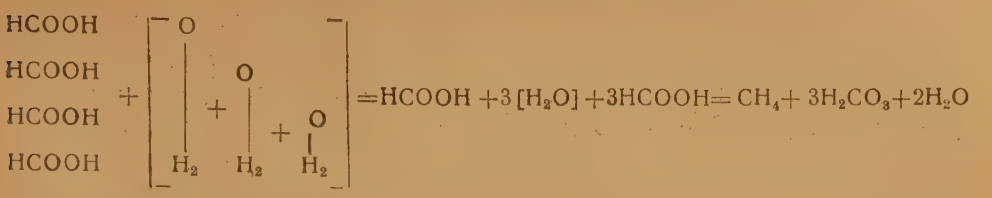
$$A + [H_2.O] + B = AH_2 + BO,$$

где A и B — отдельные атомные группировки или молекулы, а $[H_2 \cdot O]$ — символ, обозначающий реакцию сопряженного окисления — восстановления.

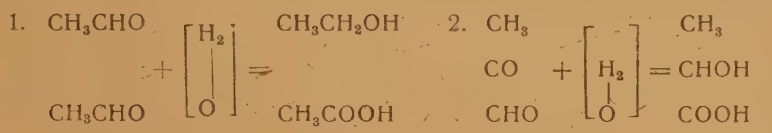
Таким образом, превращение глицерина в пропионовую кислоту можно изображать схемой:

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ CH_2OH \\ CH_2OH \end{matrix} + \begin{bmatrix} H_2 & \\ | & + H_2 \\ O & O \end{bmatrix} = CH_2OHCHOHCH_2OH + 2[H_2O] = CH_3CH_2COOH + 3H_2O$$

Соответственно, превращение муравьиной кислоты в угольную кислоту и метан представится в следующем виде:



Эта реакция сопряженного окисления — восстановления, называемая реакцией Канницаро (или диспутацией), является, повидимому, наиболее общей для ферментных систем самых различных представителей жизни. Наиболее четко эта реакция в биологической обстановке была продемонстрирована в исследованиях Нейберга с сотрудниками (Neuberg u.. Gorr [10]; Neuberg u. Windisch [11]) на отношении бактериальных ферментных систем к уксусному альдегиду (1) и метилглиоксалю (2)



Первая из них — превращение уксусного альдегида в эквимолекулярные соотношения этилового спирта и уксусной кислоты — осуществлялась ферментами уксуснокислых бактерий; вторая — превращение метилглиоксаля в молочную кислоту — происходила под влиянием ферментных систем как различных бактерий (Bact. coli, молочнокислые и пропионовокислые бактерии), так и под влиянием ферментных болтушек из тканей растений (Neuberg и Gorr) и животных (Kluyver [9]).

Нейберг, как известно, в этом факте хотел видеть подкрепление своей известной теории промежуточного образования при всех брожениях метилглиоксаля.

Теория эта одно время пользовалась самым широким признанием как среди биохимиков, так и микробиологов.

Однако уже в том же 1925 г. Шапошников[1] указывал на то, что превращение метилглиоксаля в молочную кислоту под влиянием ферментных систем самых различных организмов свидетельствует только о том, что это вещество с большой легкостью подвергается реакциям как восстановления, так и окисления.

То же, конечно, правильнно и по отношению к уксусному альдегиду, который легко подвергается превращению в уксусную кислоту и этиловый спирт.

Поэтому наглядность реакции сопряженного окисления — восстановления при применении в опытах именно уксусного альдегида и метилглиоксаля объясняется тем, что эти вещества в равной мере способны как к окислению, так и восстановлению. В других случаях она может быть обнаружена только при введении в субстрат активных акцепторов водорода или кислорода.

Так, для обнаружения «биологического восстановления», осуществляемого препаратом «Нитратредуктазы», Jamagata [7] вводил в субстрат лейкометиленблау, которая при этом окисляется в краску за счет восстановления азотной кислоты в азотистую.

Наоборот, Thunberg [12] получил превращение янтарной кислоты в фумаровую при помощи фермента «сукциндегидрогеназы» тогда, когда прибавлял к субстрату метиленовую синь, которая восстанавливалась в лейкосоединение за счет окисления (отнятия водорода) от янтарной кислоты.

---

[1] В. Н. Шапошников, 1925,— см. Захаров [1].

Таким образом, и в этих модельных опытах правильно говорить о реакциях сопряженного окисления — восстановления. Если же эти процессы трактовать как «биологическое восстановление» (Jamagata) или «биологическое окисление» (Thunberg), то это значит подчеркивать одну половину процесса и закрывать глаза на другую. Метиленовая синь или ее лейкомодификация не является только показателем определенного процесса: она является активным участником его.

За последнее время получены факты, показывающие, что при анаэробных процессах брожения искусственное введение в субстрат акцепторов водорода может создавать условия, благоприятные для использования определенных веществ, которые без этого не используются и, следовательно, не могут поддерживать жизнедеятельность.

Интересные данные в этом отношении были получены в нашей лаборатории Ярмола [6] с ацетоно-этиловыми бактериями (Bac. macerans Schardinger). Попытка культивировать названную бактерию на вытяжке из картофеля (не содержащей сбраживаемых углеводов) с добавлением к ней 2% молочной кислоты в виде Са-соли не приводила к сбраживанию последней. Однако при добавлении к среде метиленовой сини молочная кислота сбраживалась в ацетон и подсчет бактерий показывал их размножение.

Аналогичные данные были получены Семеновой при исследовании отношения к молочной кислоте Betabact. breve (Jensen). На пептонной среде с лактатом кальция в этом случае наблюдалось слабое развитие бактерий и вялое потребление молочной кислоты. При добавлении к такой среде 10 мл 1% раствора метиленовой сини на 250 мл субстрата обнаруживалось резкое повышение сбраживания молочной кислоты и значительное увеличение интенсивности размножения (табл. 1).

Таблица 1

Среда	pH Начало	pH Конец	Сброжено молочной к-ты в мМ	Число бактерий в 1 мл	Образовано	
					уксусной к-ты в мМ	спирта в мМ
Контроль	6,6	5,6	10,1	$16 \cdot 10^7$	7,0	2,8
С метиленовой синью	6,6	5,3	55,0	$40 \cdot 10^7$	28,0	1,8

Таким образом, добавление к субстрату метиленовой сини в данном случае в 5 с лишним раз увеличило потребление молочной кислоты и в 2,5 раза увеличило размножение бактерий. Факт этот, как нам кажется, представляет выдающийся интерес с двух точек зрения.

Во-первых, он показывает, что введение в субстрат вещества, которое нельзя признать ни за питательное, ни за энергетическое, повышает урожай бактерий на 150%. Это показывает, насколько осторожным нужно быть в толковании опытов с добавлением к субстрату тех или иных веществ.

Во-вторых, введение в субстрат сини резко повышает процесс брожения в сторону накопления в субстрате окисленных продуктов:

в контроле: $\frac{\text{укс. к-та}}{\text{спирт}} = \frac{7,0}{2,8} = 2,5;$

с метиленовой синью: $\frac{\text{укс. к-та}}{\text{спирт}} = \frac{28,0}{1,8} = 15,6.$

Таким образом, мы видим, что характер сбраживания может зависеть от интенсивности восстановительных процессов, осуществляющихся в субстрате вне прямой связи с собственно бродильным процессом.

Это положение кажется элементарно примитивным, и тем не менее игнорирование его не позволяет составить себе сколько-нибудь ясное представление о многих бродильных процессах.

Особое затруднение получается в том случае, когда жизнедеятельность бактерий сопровождается накоплением в субстрате не одного, а нескольких продуктов брожения, причем одни из них (часто произвольно!) принимаются за главный, а другие — за побочные продукты. В некоторых случаях говорят (Худяков [3]) о неурегулированных типах брожения, отмечая этим термином наблюдаемое в опытах непостоянство соотношений отдельных продуктов брожения.

Примеров таких брожений, которые могут быть отнесены к типу «неурегулированных», очень много. К ним относятся масляно-кислое брожение, «ацетоиновое» или «бутиленгликолевое» брожение, гетероферментативное молочнокислое, ацетоно-бутиловое и т. д. По поводу брожений «неурегулированного типа» Худяков писал [3]:

«Состав продуктов этих брожений подвергается таким сильным колебаниям, что химическая классификация их становится невозможной». Однако «причины этой изменчивости нам не известны...» К таким брожениям неурегулированного типа, по Худякову, «...прежде всего относятся многие брожения, обычно рассматриваемые как особые разновидности молочнокислого брожения» (стр. 129).

Имеется большое количество более или менее удачных попыток связать выход тех или иных продуктов с такими условиями среды, как кислотность, характер сбраживаемых веществ и пр. Эти попытки дают интересный материал для характеристики влияния условий на работу ферментных систем, но они оставляют в стороне биологическую сторону вопроса, так как не затрагивают вопроса о биологическом значении образования различных продуктов при том или ином брожении.

Мы поставили перед собой задачу попытаться подойти к освещению этих вопросов не только с биохимических, но главным образом с биологических позиций.

Поэтому мы отказались от широко применяемого в настоящее время метода изучения процессов брожения в условиях изоляции их от нормальной жизнедеятельности, в условиях применения «покоящихся клеток», то есть суспензий бактерий в среде, не обеспечивающей их развития и даже, по возможности, исключающей его. Наоборот, как в свое время мы изучали ацетоно-бутиловое и ацетоно-этиловое брожения в условиях, по возможности, нормального развития, так и теперь мы стремились изучить процессы брожения в их динамике, сопоставляя совершающиеся в субстрате процессы с развитием бактерий.

Основное внимание при этом было обращено на так называемые «побочные» продукты брожения, которые характеризуются обычно некоторым количественным непостоянством.

К ним относятся: уксусная кислота в пропионовокислом и масляно-кислом брожениях; уксусная кислота и спирт в гетероферментативном молочнокислом брожении и т. д. При этом вопрос о том, куда относить те или иные продукты, определяется не чем иным, как количественным их соотношением в субстрате.

Так, при гетероферментативном молочнокислом брожении в субстрате находят ряд продуктов брожения. Еще недавно Шапошников [4] этот тип брожения характеризовал в самой общей форме схемой,

$$C_6H_{12}O_6 \left\{ \begin{array}{l} \text{молочная кислота} \\ \text{уксусная} \quad » \\ \text{спирт} \\ \text{углекислота} \end{array} \right.$$

представляющей лишь перечень тех продуктов, которые при нем образуются. При этом в списке добавлялось.

«Этот процесс сбраживания пока еще не может быть выражен определенной формулой, так как соотношение продуктов пока не определено с достаточной полнотой и чаще всего колеблется в значительных границах» (стр. 14).

«Основным» продуктом брожения при этом, так же как и при всяком молочнокислом брожении, принято считать молочную кислоту. И действительно, в диагностическое определение группы входит пункт преимущественного образования из сахара молочной кислоты. В обычных культурах на сусле или пептон-глюкозе в присутствии избытка мела в 5—10-дневных опытах получают следующие соотношения продуктов, например: молочной кислоты — 60%, уксусной кислоты — 10%, спирта — 30%. Но оказывается — это частный случай. В опытах без мела мы получаем иное соотношение: молочной кислоты около 35%, уксусной кислоты — 48%, спирта — 17%. Основным продуктом по количеству оказывается уксусная кислота. Больше того, если подходить к брожению с пастеровских позиций — как к основному энергетическому процессу, необходимому для осуществления жизнедеятельности в анаэробных условиях и заменяющему процесс дыхания, то и с этих позиций образование молочной кислоты при этом брожении не вполне соответствует понятию. Действительно, можно создать такие условия культивирования, при которых развитие бактерий не только не сопровождается образованием молочной кислоты, но, наоборот, последняя потребляется.

Эти условия легко создаются культивированием на среде, в которой наряду с глюкозой имеется молочная кислота в виде ее Са-соли и реакция среды близка к нейтральности.

Результаты одного из таких опытов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Состав среды: экстракт из 0,25% дрожжей; KH_2PO_4 — 0,05%; K_2HPO_4 — 0,05% $MgSO_4$ — 0,02%; пептон Дифко — 0,5%; глюкоза — 1%; молочная кислота в виде лактата кальция — 1%; начальное значение pH = 7,6

Время от начала опыта (в час.)	pH	Образовалось			Сброжено	
		молочной к-ты в мМ	уксусной к-ты в мМ	спирта в мМ	глюкозы в мМ	молочной к-ты в мМ
4	6,6	0	9,6	4,6	4,5	4,4
8	6,3	0	9,9	6,4	6,4	6,2
24	6,1	4,2	13,2	5,1	11,7	0
120	5,2	18,0	17,0	17,5	30,0	0

Таблица показывает прежде всего, что лактат кальция является буфером, умеряющим падение значения активной кислоты, в силу чего брожение может продолжаться значительно дольше, чем с одним сахаром. Что же касается образования молочной кислоты, то оно становится заметным только при достижении pH среды = 6, тогда как в условиях более щелочных имеет место не образование, а потребление молочной кислоты. Основным продуктом брожения при реакции среды, близкой к нейтральной, в присутствии молочной кислоты является уксусная кислота. Таким образом, за первые 8 часов брожения мы имели в этом случае образование уксусной кислоты (и спирта) за счет потребления как глюкозы, так и молочной кислоты, причем активная кислотность за этот период резко снижалась, достигая значения 6. Начиная с этого момента, происходит перелом брожения: уксусная кисло-

та почти не образуется, зато наблюдается интенсивное образование молочной кислоты, причем pH за этот период падает менее резко.

Таким образом, образование молочной кислоты из сахара не является безусловной предпосылкой для осуществления жизнедеятельности данной бактерии.

Тогда, естественно, должен возникать вопрос о том, за счет каких процессов энергетического характера осуществляется развитие данных бактерий, если оно идет не за счет молочнокислого сбраживания углеводов.

При решении этого вопроса мы исходили из сопоставления темпа развития с характером сбраживания.

Один из типичных опытов такого рода приведен на табл. 3.

Таблица 3

Состав среды: глюкоза — 3%; экстракт сухих дрожжей — 0,25%; K_2HPO_4 — 0,05%; KH_2PO_4 — 0,05%; $MgSO_4$ — 0,02%; пептон Дифко — 0,5%; начальное значение pH = 6,8

Время от начала опыта (в час.)	pH	Сброжено глюкозы в мМ	Образовано мМ		
			молочной к-ты	уксусной к-ты	спирта
2	6,65	11	2,2	8,2	8,1
8	6,3	16	3,7	13,3	8,1
12	5,5	18,6	7,9	14,1	10,8
15	5,0	21,4	9,0	14,7	—

Данные этой таблицы для наглядности в несколько схематизированном виде представлены на рисунке (рис. 1).

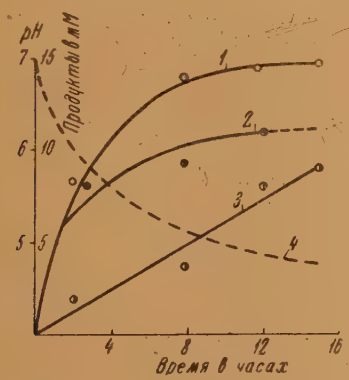


Рис. 1. *1* — уксусная кислота; *2* — спирт; *3* — молочная кислота; *4* — pH

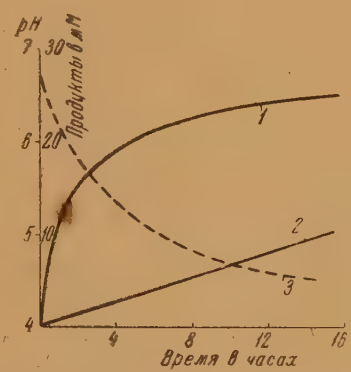


Рис. 2. *1* — пировиноградная кислота; *2* — молочная кислота; *3* — pH

Таким образом, первое время, когда наиболее энергично идет развитие бактерий, главными продуктами энергетического обмена веществ (т. е. в данном случае брожения) являются уксусная кислота и спирт. Но, согласно современным представлениям, то и другое являются дериватами пировиноградной кислоты. Таким образом, на первых этапах развития культуры мы имеем преимущественное образование пировиноградной кислоты (рис. 2), во много раз превышающее образование молочной кислоты.

Отношение пировиноградной кислоты к молочной меняется по ходу брожения следующим образом:

Через 2 часа оно равно $\frac{162}{22} = 7$

» 8 час. » » $\frac{214}{37} = 5{,}75$

» 12 » » » $\frac{240}{79} = 3$

Легко убедиться, что интенсивное образование в первый период уксусной кислоты соответствует периоду наиболее интенсивного развития культуры. Это наглядно может быть показано на данных опытов, проведенных с учетом образования в культуре уксусной и молочной кислот[2] и параллельным подсчетом бактерий (опыт проводился с культурой Betabact. breve на разведенном сусле с содержанием сахара около 1%).

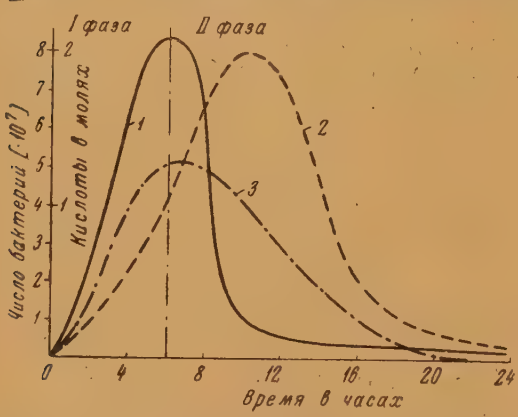


Рис. 3. *1* — уксусная кислота; *2* — молочная кислота; *3* — бактерии

Рис. 3 представляет изменение скоростей образования кислот и развития бактерий в одном из таких опытов. На оси абсцисс — время в часах, на оси ординат — скорости образования уксусной, молочной кислот и нарастания числа бактерий.

Рисунок показывает, что нарастание скорости размножения действительно связано с нарастанием образования уксусной кислоты и максимумы для того и другого совпадают. Нарастание же скорости образования молочной кислоты значительно отстает во времени.

Те достаточно глубокие различия, которые наблюдаются при сбраживании сахара в присутствии или отсутствие мела в среде, могут быть связаны как с условиями активной кислотности, так и с длительностью процесса.

Действительно, при брожении в отсутствие мела мы имеем процесс, протекающий при постепенном подкислении субстрата до pH = около 4,0 за период времени в 16—20 часов, после чего брожение останавливается. При этом, как видно из приведенных в табл. 2 и рис. 1 данных, уксусная кислота и спирт интенсивно накапливаются только в тот период брожения, пока кислотность субстрата не сильно снижена (pH = 7—5,8). После этого преимущественно образуется молочная кислота, количество которой не достигает, однако, количества образованной пировиноградной кислоты.

В присутствии мела pH среды постепенно снижается, приблизительно до pH = 6, на котором в дальнейшем удерживается. Это значение pH позволяет брожению итти длительное время (7—8 дней), причем за исключением первых часов брожения основным продуктом становится молочная кислота.

[2] Опыты проводились в нашей лаборатории студенткой М. Лебедевой.

Таким образом, мы должны признать, что имеется определенная связь между изменениями активной кислотности среды и соотношением продуктов брожения. Но значит ли это, что активная кислотность среды определяет, как это нередко принимается, направление деятельности бродильных ферментов, активируя одни из них и затормаживая деятельность других?

Легко убедиться, что такое механистическое представление прямого воздействия активной реакции среды на деятельность ферментов — не обосновано. Оно не базируется на учете биологической стороны явления.

Мы видели, что в первые часы брожения основным продуктом изменения сахара оказывается пировиноградная кислота, в дальнейшем подвергающаяся декарбоксилированию и превращению за счет окисления в уксусную кислоту или восстановления в этиловый спирт.

Но пировиноградная кислота, как это ясно само по себе, является продуктом окисления триозы.

$$C_3H_6O_3 + O = CH_3\,COCOOH + H_2O.$$

Поэтому, естественно, возникает вопрос: чем компенсируется это окисление в условиях анаэробной культуры?

Отмечая на основании предыдущего, что дериваты пировиноградной кислоты наиболее интенсивно образуются в период наиболее интенсивного развития бактерий, мы вынуждены будем допустить, что сдвиг брожения за первые часы в сторону окисленных продуктов может определяться не чем иным, как темпом размножения.

Таким образом, мы вынуждены допустить, что само по себе развитие бактерий является акцептором водорода. Несомненно, это так и есть, так как конструктивный метаболизм связан с бо́льшим или меньшим потреблением водорода. При этом степень потребления водорода в конструктивном метаболизме может быть весьма различной в зависимости от исходных веществ.

С точки зрения взаимоотношений с веществами субстрата анаэробных культур можно отметить два диаметрально противоположных случая.

У автотрофных пурпурных бактерий, использующих в качестве основного строительного материала наиболее окисленное соединение углерода — угольную кислоту, ассимиляция последней, естественно, связана с весьма значительным потреблением водорода. В силу этого весь водород окислительно-восстановительных реакций потребляется в данном случае в конструктивном метаболизме, и отходами жизни, накапливающимися в субстрате, будут продукты окисления — серная кислота или конечные продукты окисления органических кислот.

В противоположность этому у гомоферментативных молочнокислых бактерий, единственным продуктом жизнедеятельности которых в субстрате оказывается молочная кислота, последняя, как мы видели, получается из сахара за счет уравновешенного использования как окислительных, так и восстановительных реакций. Объясняется это тем, что эти бактерии, по всем имеющимся данным (Шапошников и Мантейфель [5]; Jensen [8]), строят свое тело за счет ассимиляции белковых веществ, т. е. тел, наиболее восстановленных и во всяком случае по степени восстановленности наименее отличающихся от веществ живого тела бактерий.

Это наглядно представлено в табл. 4.

Углеводы, как мы видим, занимают промежуточное положение между белками и углекислотой. В силу этого построение живого вещества за счет ассимиляции углеводов, естественно, также связано с их вос-

Таблица 4

Химический состав	C	H	O	N
Бактерий (по van Niel, 1936) . . .	100	13	45,2	21,2
Белков запасных (по Костычеву) .	100	13,2	43,4	30,2
Углеводов	100	16,7 (13)	132,5 (102,5)	—
Угольной кислоты	100	16,0	306,5	—

становлением, хотя и более умеренным, чем ассимиляция угольной кислоты.

С некоторым приближением можно считать, что для превращения 100 весовых частей углерода углеводов в 100 весовых частей углерода тела бактерий необходимо от них отнять приблизительно $^2/_3$ кислорода.

Поэтому ассимиляцию углеводов (триозы) можно схематически представить в следующем виде

$$x\,(C_3H_6O_3 + 2H_2) \rightarrow \text{живое вещество.}$$

Но в анаэробных условиях это восстановление должно быть компенсировано соответствующим окислением:

$$x\,(2C_3H_6O_3 + 2O) \rightarrow 2x\,(H_2O + C_3H_4O_3) \rightarrow 2x\ CH_3COCOOH.$$

Таким образом, ассимиляция каждой молекулы триозы неминуемо сопровождается накоплением в субстрате двойного количества окисленных молекул триозы, т. е. пировиноградной кислоты, которая в дальнейшем превращается в уксусную кислоту и спирт.

Вполне понятно, что величина коэффициента x будет зависеть от темпа размножения и в наших лабораторных культурах будет непрерывно меняться, являясь в каждый данный момент пропорциональной скорости новообразования живого вещества, т. е. скорости размножения. Таким образом, различные случаи взаимоотношений бактерий с веществами субстрата можно выразить следующими схемами, в которых C обозначает вещества, потребляемые в конструктивном метаболизме, и $Э$ — вещества энергетического обмена веществ. В зависимости от степени восстановленности (окисленности) C-веществ возможны три случая:

I. C — предельно окисленное тело (H_2CO_3)

$$C + m\,(H_2O) + Э = C\,(m\,H_2) + Э\,(m\,O)$$

II. C_0 — белковые вещества, близкие по степени восстановления к веществам живого тела

$$C_0 + m\,(H_2O) + Э = C_0 + Э\begin{cases} m\,H_2 \\ m\,O \end{cases}$$

III. c — вещества типа углеводов, подвергающиеся умеренному восстановлению в конструктивном метаболизме

$$c + m\,(H_2O) + Э = c\,(m\,H_2) + Э\begin{cases} (m-n)\,H_2 \\ m\,O \end{cases}$$

В последнем случае, когда тела типа углеводов служат основным материалом как для конструктивного, так и энергетического обменов, распределение окислительных и восстановительных реакций должно меняться по ходу процесса в зависимости от скорости размножения.

В период наибольшей скорости размножения[3] потребление водорода в конструктивном метаболизме наиболее интенсивно и может теоретически достигать его полного исчерпывания в реакциях конструктивного обмена (рис. 4, I). В этот период продукты брожения характеризуются преобладанием окисленных веществ (спирт и уксусная кислота в нашем случае).

Рис. 4

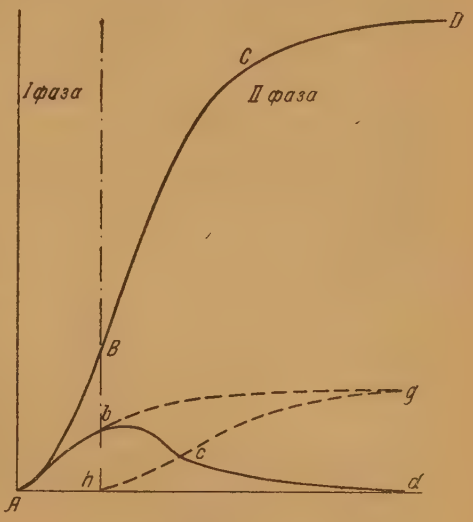


Рис. 5

По мере уменьшения скорости размножения и при условии сохранения интенсивности ферментативной активности не весь водород потребляется в конструктивном метаболизме: часть его потребляется на образование продуктов брожения (рис. 4, II), и в конце концов процесс брожения приближается к уравновешенному окислению — восстановлению (рис. 4, III).

Таким образом, течение процесса гетероферментативного молочнокислого брожения (на примере Betabact. breve) в среде без мела можно схематизировать в следующем виде (рис. 5).

Кривая *ABCD* представляет нормальное нарастание общего числа бактерий в культуре, а кривая *Abcd* — изменение скорости размножения их.

Так как ферментативную активность развивающейся культуры можно принимать пропорциональной числу бактерий в каждый данный момент, то активность окислительно-восстановительных реакций может быть представлена кривой *Abg*.

Кривая *Abg* представляет, таким образом, интенсивность (скорость) потребления при развитии культуры как водорода (H_2), так и кислорода (O).

Кривая *Abcd* представляет скорость размножения бактерии и пропорциональное ей потребление водорода (H_2) в конструктивном метаболизме.

Таким образом, первый период развития культуры (первая фаза), характеризующийся быстрым нарастанием скорости размножения бактерий, может сопровождаться полным потреблением водорода окислительно-восстановительных реакций конструктивного метаболизма. За

[3] Хотя максимальная скорость размножения достигается обычно не сразу после инокуляции свежего субстрата, однако этот начальный период подчиняется тем же закономерностям, с точки зрения распределения окислительно-восстановительных реакций, интенсивность которых возрастает вместе с возрастанием скорости размножения.

этот период продуктами брожения явятся вещества, образующиеся путем окисления бродильного материала; водород же целиком потребляется на реакции построения тела бактерии.

Происходящее в дальнейшем (отрезок *bcd*) уменьшение скорости размножения приводит к неполному потреблению в конструктивном обмене водорода, который благодаря этому все в большем масштабе начинает принимать участие в образовании продуктов брожения (площадь *gbcd* и кривая *hcg*).

Таким образом, площадь нашего графика *Abgd* соответствует потреблению кислорода (О) на образование продуктов брожения. Площадь *ABcd* — потреблению водорода (H_2) на реакции конструктивного обмена, а площадь *gchd* или равновеликая ей *gbcd* — участию водорода (H_2) в образовании продуктов брожения.

График построен на допущении, что в первой фазе развития культуры бродильные процессы связаны только с окислением бродильного материала и только во вторую фазу, по мере уменьшения темпа размножения, в образовании продуктов брожения начинают принимать участие также и восстановительные процессы.

В разобранном схематическом случае мы исходили из положения о том, что в первый период брожения весь водород окислительно-восстановительных реакций потребляется в конструктивном метаболизме. Этого может и не быть. Во многих случаях наблюдается некоторое, большее или меньшее, участие восстановительных реакций в процессах брожения с самых первых моментов развития культуры. Это имеет место в том случае, когда потребление водорода в конструктивном метаболизме отстает от ферментативной активности процессов сопряженного окисления — восстановления. Это отставание может определяться заниженным темпом развития (например, в кислой среде) или использованием в конструктивном обмене наряду с углеводами также и более восстановленных тел.

В этом случае граница между первой и второй фазами становится расплывчатой и вторая фаза будет отличаться только относительным увеличением восстановительных реакций в бродильных процессах.

Выводы

Таким образом, первым, напрашивающимся из приведенных фактов выводом является необходимость характеризовать представителей группы молочнокислых бактерий различным отношением их к углеводам с точки зрения конструктивного использования этих последних. Тогда как истинные молочнокислые бактерии характеризуются по крайней мере преимущественным использованием белковых тел на построение своего тела, а углеводы потребляются преимущественно в качестве бродильного материала, гетероферментативные молочнокислые бактерии используют углеводы как в конструктивном, так и в энергетическом обменах веществ.

Использование углеводов в конструктивном метаболизме связано с их восстановлением, т. е. с потреблением водорода в процессах ассимиляции, сопровождающимся окислительными реакциями в бродильных процессах, приводящих к накоплению относительно окисленных продуктов дериватов пировиноградной кислоты (уксусная кислота, этиловый спирт и углекислота).

Потребление водорода в конструктивном метаболизме особенно энергично в нейтральных средах за первые часы, когда происходит наиболее энергичное размножение бактерий. По мере подкисления субстрата энергия размножения снижается, а вместе с тем снижается и потребление водорода в конструктивном метаболизме. В силу этого

основным продуктом жизнедеятельности становится молочная кислота, т. е. тело, получающееся из углеводов путем уравновешенного по масштабу потребления H_2 и О.

Кафедра микробиологии
биологического факультета
Московского государственного
университета

Получено 30.X.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Захаров И. К химизму молочнокислого брожения. Журн. Русск. физико-хим. об-ва, часть хим., VIII, 584, 1939.
2. Семенова В. Гетероферментативное молочнокислое брожение, осуществляемое культурой. Betabact. breve. Диссертация. МГУ, 1947.
3. Худяков Н. Сельскохозяйственная микробиология, Москва, 1925.
4. Шапошников В. Н. О значении физиологических признаков систематики микроорганизмов. II. О генетической связи энергетических процессов. Микробиология, XIII, 1, 1944.
5. Шапошников В. Н. и Мантейфель А. Я. К физиологии Bac. acidificans longissimus (Bact. Delbrückii) в связи с возможностью использования в производстве молочной кислоты. Тр. Хим.-фарм. ин-та, вып. 7, 1923.
6. Ярмола Г. О сбраживании трехуглеродных соединений культуры Bac. macerans. Диссертация. МГУ, 1947.
7. Jamagata S. Über die Nitratreduktase und die «Nitritreduktase» — ein neues Enzym von Bact. pyocyaneum. Acta phytochemica, **11**, 157, 1939.
8. Jensen O. Die Stickstoffnahrung der Milchsäurebakterien. Ctbl. Bakt., II Abt., **94**, 460, 1936.
9. Kluyver A. Die bakteriellen Zuckervergärungen. Erg. Enzym., IV, 230, 1935.
10. Neuberg C. u. Gorr G. Über den Mechanismus der Milchsäurebildung. Biochem. Z., **171**, 1926.
11. Neuberg C. u. Windisch F. Über die Essiggärung u. die chemische Leistungen der Essigbakterien. Biochem. Z., **166**, 454, 1925.
12. Thunberg T. Die Dehydrogenasenforschungen der letzten Jahre. Erg. Enzym., VII, 105, 1938.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ПРОЦЕССОВ КОНСТРУКТИВНОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

I. BACTERIUM FORMICUM

А. Я. Мантейфель, В. Богданова и И. Четверикова

Чрезвычайно мало обследована в мире микроорганизмов взаимосвязь процессов конструктивного и энергетического метаболизмов. Однако взаимоотношения этих процессов представляют большой интерес, и понимание их может выяснить многие темные стороны в каждом из этих процессов.

Как сочетаются между собой реакции конструктивного и энергетического характера в живом организме? Шапошников [5] принимает, что конструктивные и энергетические процессы тесно связаны между собой и в основе обмена веществ лежат реакции сопряженного окисления — восстановления, причем реакции окисления в основном связаны с энергетическим обменом веществ, а реакции восстановления — с конструктивным.

В процессах брожения использование углеродистого материала идет главным образом для получения энергии; небольшая часть его, однако, употребляется и для конструктивного метаболизма. Материалом для того и другого процесса может быть одно и то же вещество. Таких примеров можно привести много; одним из них может служить отношение уксуснокислых бактерий к глюкозе, которая для этих бактерий может служить энергетическим веществом, окисляясь в глюконовую кислоту, и, с другой стороны может потребляться в конструктивном метаболизме. Однако это не всегда бывает так. Некоторые вещества используются только в качестве источников энергии и не могут использоваться как источники конструктивного метаболизма: для тех же уксуснокислых бактерий, по данным Ваттермана [9], спирт является весьма ценным энергетическим веществом, но он не потребляется бактериями для построения своего тела.

Очевидно, что во всех работах, ставящих себе целью сопоставить протекание реакций конструктивного и энергетического метаболизма, необходимо изучение развивающихся культур бактерий. Опыты с покоящимися культурами, так часто применяющиеся за последнее время для изучения отдельных вопросов химизма брожения, в данном случае представляются неприменимыми. Это вытекает из того, что в них мы в большей или меньшей степени исключаем процесс конструктивного метаболизма, а следовательно, и те реакции, которые с ним связаны, и потому искусственно изменяем и весь сложный процесс, в естественных условиях складывающийся из взаимодействия реакций того и другого метаболизма.

Изучать взаимосвязь процессов конструктивного и энергетического метаболизма у гетеротрофных бактерий, казалось бы, легче всего, применяя среду с наиболее простыми соединениями углерода, которые одновременно могут служить источниками для того и другого процесса. И чем проще среда, тем легче разобраться в сложных процессах, в ней происходящих. Наиболее простыми источниками углерода надо при-

знать монокарбоновые соединения. Из последних мы остановились на солях муравьиной кислоты.

Муравьиная кислота, в числе других органических кислот, постоянно образуется в природе при разложении различных органических соединений. Однако ввиду того, что она не накапливается, очевидно, в дальнейшем идет ее постоянное разложение. Происходит ли оно чисто химическим путем или под влиянием особых микроорганизмов? Maassen [6] и другие исследователи установили разложение муравьинокислого кальция и натра. Омелянский [4] выделил в чистой культуре и изучил организм, разлагающий соли муравьиной кислоты. Накопительную культуру Омелянский вел на среде с $Ca(COOH)_2$ и 0,2% пептона, при заражении конским навозом, причем выпадающий $CaCO_3$ служил показателем идущего процесса. Эта маленькая (0,7—0,8 $\mu \times 2$—3 μ), подвижная, грамотрицательная, факультативно анаэробная, бесспоровая палочка была названа им Bact. formicicum. Stephenson и Stickland [7], отнеся этот организм к Coli-тифозной группе, предложили для него название Echerichia formica, которое и было принято Бердже в его определителе. Bact. formicum, кроме солей муравьиной кислоты, легко использует также различные источники углерода (глюкоза, галактоза, мальтоза и др.); развивается также и на МПБ. Чрезвычайно характерны ее колонии на агаровых средах, содержащих муравьинокислый кальций. В молодых колониях встречаются кристаллики мела, а старые колонии представляют собой плотную коричневую пленочку из мела и бактерий, целиком снимающуюся с агара.

При культурах на жидких средах с муравьинокислым натром происходит резкое подщелачивание среды, почему для культур предпочтительнее брать муравьинокислый кальций.

При разложении муравьинокислого кальция образуются газы, причем Омелянский установил в них наличие CO_2 и H_2. Stephenson и Stickland в 1931 г. [7] выделили организм, близкий к Bact. formicicum Омелянского, и установили разложение им солей муравьиной кислоты с образованием CO_2, CH_4, и H_2O. В 1933 г., сверив полученные данные с культурой, выделенной из одной клетки, они подтвердили свои результаты, полученные в 1931 г. [8].

Работа велась ими с отмытыми суспензиями бактерий в строго анаэробных условиях.

Красина [3], сопоставляя эти две работы, попыталась объяснить разногласие между ними.

Формула брожения Омелянского:

$$Ca(COOH)_2 + H_2O = CaCO_3 + CO_2 + 2H_2;$$

Формула брожения Стефенсона и Стиклянд:

$$4HCOOH = CH_4 + 2CO_2 + 2H_2O,$$

причем авторы считают, что реакция протекает в две стадии:

$$1)\ HCOOH = H_2 + CO_2$$

$$2)\ 4H_2 + CO_2 = CH_4 + 2H_2O.$$

Таким образом, в одном случае конечными продуктами являются CO_2 и H_2, а в другом — CO_2 и CH_4.

Установив, что разница в этих двух работах была в самой постановке опытов, Красина провела свои опыты, с одной стороны, по Омелянскому, не создавая вначале анаэробиоза, и, с другой стороны,— по Стефенсону, создавая строгий анаэробиоз. В обоих случаях она работала с развивающимися культурами и подтвердила данные, полученные этими исследователями.

Действительно, в первом случае (начальный $rH_2 = 21{,}8$, конечный =

= 11—10,7) образовывался водород, а CH_4 не было, а во втором (rH_2 = = 6—7) — образовалось значительное количество метана.

Таким образом, из работы Красиной следует, что от окислительно-восстановительных условий среды (или, может быть, от наличия или отсутствия кислорода) зависит образование одной и той же культурой H_2 или CH_4.

Главное внимание в приведенных выше работах было сосредоточено на газообразных продуктах жизнедеятельности.

Однако несомненный интерес представляет вопрос о том, может ли муравьиная кислота использоваться в качестве материала для построения тела бактерий. Вопрос этот представляет тем больший интерес, что муравьиная кислота является телом, весьма близким к угольной кислоте; ее можно рассматривать как альдегид угольной кислоты.

Экспериментальная часть

Нами было выделено несколько культур бактерий, разлагающих соли муравьиной кислоты, из илов различного происхождения. Их морфологические и физиологические свойства были настолько близки, что, очевидно, все они являлись одним и тем же видом, по всем признакам идентичным с Bact. formicicum, подробно описанным Омелянским, почему мы и не даем полного его описания.

Для накопительной культуры служила среда Омелянского [2% $Ca(COOH)_2$, 0,5% пептона Дифко, водопроводная вода [1]]; для выделения — та же среда, но агаризованная, или МПА. Опыты велись в больших высоких пробирках — цилиндрах с 80 $см^3$ жидкости, под слоем вазелинового масла, и пробы отбирались по ходу процесса из одной и той же пробирки. Определение летучих кислот велось отгонкой с водяным паром; соотношение их устанавливалось разгонкой по Дюкло.

Муравьиная кислота параллельно определялась по методу Финке — Уткина, а также для проверки — разрушением ее хромовой смесью, с последующей отгонкой летучих кислот. pH определялось колориметрически по бромтимолблау и потенциометрически.

Омелянский для своих опытов применял среду с муравьинокислым кальцием и пептоном. Однако нам представлялось чрезвычайно заманчивым исключить из среды пептон (как весьма неопределенную в химическом отношении смесь веществ) и заменить его неорганическим источником азота, т. е. создать полностью синтетическую среду. Поэтому первые опыты были проведены на среде такого состава: муравьинокислый кальций — 2%; $(NH_4)_2SO_4$ — 0,2%; водопроводная вода; они дали отрицательные результаты — развитие было чрезвычайно слабое.

Надо указать, что вопрос о потребности Bact. formicum в витаминах, повидимому, еще не обследован, по крайней мере в литературе он совершенно не освещен. Можно было предположить, что в природных условиях, в местах развития Bact. formicum и разложения муравьиной кислоты, витамины могут встречаться, так как идет разложение органических остатков растений и животных, поэтому возможно, что Bact. formicum, довольствуясь витаминами, находящимися в окружающей среде, не выработала способности построения нужных ей витаминов.

Как источник витаминов мы применили дрожжевой автолизат. Предварительные опыты нас убедили, что только при прибавлении к водопроводной воде 0,5% дрожжевого автолизата начиналось развитие бактерий, т. е. в этом случае дрожжевой автолизат служил уже источником питательных веществ для бактерий. Поэтому, чтобы иметь воз-

[1] Надо указать, что у Омелянского брожение в накопительной культуре начиналось через 1—2 недели, у нас же — на 3-й день, при 30°, всегда начиналось газовыделение.

можность рассматривать дрожжевой автолизат только как источник витаминов, мы брали более низкие дозы: 0,4; 0,2 и 0,1% и добавляли их к вышеуказанной синтетической среде. Во всех случаях развитие бактерий было, однако, значительно менее интенсивное, чем в контроле (среда с муравьинокислым кальцием и пептоном). Брожение сопровождалось сильным газовыделением, однако начиналось с замедлением, и сумма выделившегося газа была значительно меньше. На среде с пептоном за 5 суток выделено газа 2,75 г/л; на синтетической среде с автолизатом за 5 суток выделено газа 1,50 г/л.

Надо указать, что в этом брожении существует резкое противоречие между силой газовыделения, определяемой на глаз и определяемой по взвешиванию: несмотря на то, что газовыделение кажется очень интенсивным, потеря в весе сравнительно с другими брожениями ничтожна. Это объясняется тем, что CO_2 связывается освобождающимся Ca, а выделяются H_2 или CH_4, т. е. чрезвычайно легкие газы.

Таким образом была доказана возможность развития Bact. formicum на синтетической среде с дрожжевым автолизатом и, следовательно, как будто выявлена потребность у этого вида бактерий в витаминах. Поэтому естественно было перейти к изучению отношения Bactericum formicum к витаминам.

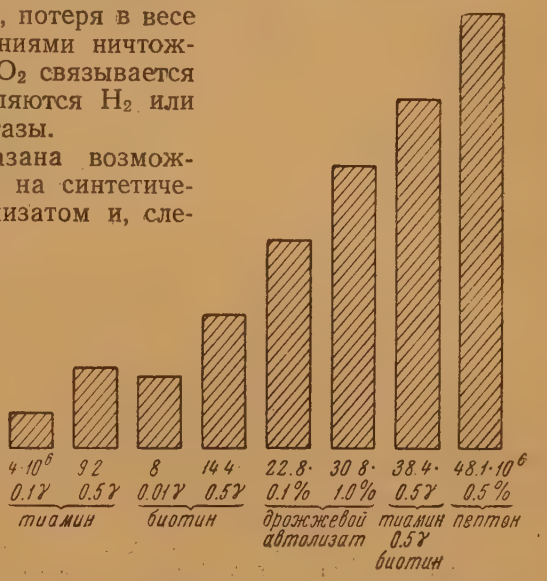


Рис. 1. Количество бактерий в 1 см³ при культурах на средах с различными источниками витаминов

Ввиду имеющихся в литературе указаний, что биотин является важным ростовым веществом для многих видов бактерий (Staphylococcus pyogenes aureus, некоторых молочнокислых, Clostridium acetobutylicum, клубеньковых, и т. д.[2]), мы прежде всего испытали его действие на Bact. formicum. Однако встречаются также указания, что для некоторых микроорганизмов положительный результат получается только при одновременном действии биотина и тиамина (аневрина) или во всяком случае добавление тиамина стимулирует развитие (Иерусалимский [2] — для ацетоноэтиловых бактерий и др.). Поэтому мы одновременно испытали и действие добавок тиамина. Опыты проводились на той же синтетической среде [$(NH_4)_2SO_4$ + $Ca(COOH)_2$], к которой добавлялся в одной серии биотин в количествах 0,01 γ, 0,05 γ, 0,1 γ, 0,5 γ и 0,7 γ на 1 см³ среды, а в другой — тиамин — 0,1 γ, 0,5 γ, 0,1 γ 0,5 γ и 0,7 γ на 1 см³ среды, а в этих средах шло весьма медленно. Только на пятые сутки началось помутнение среды, и конечный подсчет клеток дал очень малые числа (рис. 1).

Все же были установлены оптимальные дозы этих витаминов, которые оказались для биотина[3] 0,5 γ на 1 см³ и для тиамина 0,5—1 γ на 1 см³. При одновременном добавлении обоих витаминов в оптималь-

[2] См. Обзор Иерусалимского [1].

[3] Оптимальная дозировка биотина оказалась очень высокой по сравнению с литературными данными. Но так как нашей задачей являлось только выяснение вопроса об использовании муравьиной кислоты в конструктивном метаболизме, то точное содержание биотина в исходном препарате мы не устанавливали.

ных дозах были получены уже значительно более высокие результаты. Брожение наступало гораздо раньше. Подсчет бактерий показал более высокие данные, чем на среде с дрожжевым автолизатом, и лишь немного меньше, чем на среде с пептоном (рис. 1).

Таким образом, чисто синтетическая среда с добавлением биотина и тиамина оказалась вполне удовлетворительной для развития Bact. formicum. На этой среде идет довольно интенсивное разложение муравьиной кислоты. В табл. 1 приведены количества муравьиной кислоты в среде на различных применявшихся средах через два дня и через десять дней от начала брожения.

Таблица 1

Среда	Содержание муравьиной кислоты в мМ на 1 л		
	Среда с добавлением 0,2% $(NH_4)_2SO_4$ + + 0,2% дрожжевого автолизата	Среда с добавлением 0,2% $(NH_4)_2SO_4$ + + 0,5 γ тиамина + 0,5 γ биотина	Среда с добавлением 0,5% пептона
Исходная	327,8	332,6	445,8
Через 2 дня	311,8	231,6	423,8
» 10 дней	305,6	206,0	271,8

В табл. 2 приведены количества разложенной кислоты на этих же средах.

Таблица 2

Сброжено муравьиной кислоты за 10 дней на средах	В мМ на 1 л	В мМ на 100 см³ среды	% от начальн. количества
С добавлением 0,2% $(NH_4)_2SO_4$ + 0,2% дрожжев. автолизата	22,2	102,0	6,8
С добавлением 0,2% $(NH_4)_2SO_4$ + 0,5 γ тиамина + 0,5 γ биотина	126,6	582,4	38,1
С добавлением 0,5% пептона	174,0	800,0	39,1

Мы видим, что тогда как на среде с добавлением автолизата муравьиной кислоты разложено чрезвычайно мало, на среде с двумя витаминами разложено столько же, как на среде с пептоном (38 и 39% от первоначального количества).

Эти опыты с совершенной ясностью показали, что Bact. formicum может использовать муравьиную кислоту и в энергетическом и в конструктивном метаболизме, так как в среде с добавлением тиамина и биотина кальциевая соль этой кислоты была единственным источником углерода.

По всей вероятности, это использование муравьиной кислоты в конструктивном метаболизме весьма близко к усвоению CO_2 автотрофными микроорганизмами и идет также через формальдегид. Можно себе представить, что здесь происходит процесс сопряженного окисления — восстановления под действием воды:

$$\left.\begin{matrix} HCOOH \leftarrow H_2 \\ | \\ HCOOH \leftarrow O \end{matrix}\right\} = \left\{\begin{matrix} HCHO + H_2O + \\ + H_2CO_3 \end{matrix}\right.$$

Следовательно, в процессе конструктивного метаболизма в анаэробных условиях одна молекула муравьиной кислоты восстанавливается с образованием формальдегида, а другая окисляется с образованием угольной кислоты и с выделением энергии.

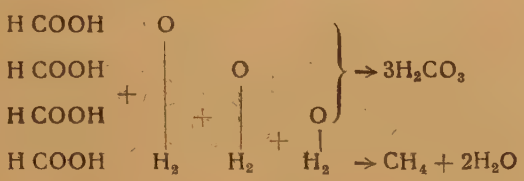
Энергетический баланс реакций образования пластического материала клеток и специальных энергетических реакций установить чрезвычайно трудно, но очевидно, что при жизни в анаэробных условиях энергии, выделенной при окислительной части процесса конструктивного метаболизма, недостаточно для поддержания жизни и организм вынужден проводить дополнительное окисление той же муравьиной кислоты.

Этот процесс в анаэробных условиях, очевидно, является процессом сопряженного окисления — восстановления за счет ионов воды.

Стефенсон и Стиклянд представляют его следующей формулой:

$$4\,HCOOH + 3H_2O = 3CO_2 + 5H_2O + CH_4 + 39 \text{ кал.}$$

В расшифрованном виде можно эту формулу по Шапошникову [5] представить так:



т. е. из четырех молекул муравьиной кислоты три окисляются, давая угольную кислоту и нужную энергию, а четвертая восстанавливается в метан.

Таким образом, легко себе представить образование при сбраживании муравьиной кислоты как CO_2, так и CH_4, которые и являются главными окончательными продуктами брожения.

Однако надо указать, что еще Омелянский обнаружил в культуре Bact. formicum следы уксусной кислоты. Действительно ли она образуется в этом брожении и как объяснить ее появление?

Наши ориентировочные опыты показали прежде всего, что если вести брожение при начальном pH = около 7,6, то это значение pH остается (в среде с муравьинокислым кальцием) почти постоянным до конца опыта. Факт сам по себе очень интересный, так как при потреблении муравьиной кислоты из муравьинокислого кальция, особенно при

Таблица 3

Начальный pH	Начальный вес в г	Время от начала опыта в сутках					
		2		3		6	
		pH	вес в г	pH	вес в г	pH	вес в г
4,7	185,98	—	—	—	—	—	—
5,7	190,85	—	—	—	—	—	—
6,3	187,67	—	187,60	7,3	187,55	7,5	187,5
7,6	183,32	7,5	183,28	7,5	183,20	7,5	183,2
8,6	177,9	8,1	177,78	7,5	177,73	7,5	177,7

Примечание.— Отсутствие развития

образовании метана, должно происходить подщелачивание среды освобождающимся кальцием. Поэтому мы занялись изучением изменения

pH по ходу брожения и влияния различного начального pH на развитие и жизнедеятельность Bact. formicum.

Опыты проводились на среде с $Ca(COOH)_2$, пептоном и фосфорнокислыми солями на водопроводной воде. Брожение шло в высоких пробирках с резиновыми трубками и затворами с серной кислотой. Среда заливалась маслом. О развитии бактерий судили по потере в весе (т. е. по выделению газов). Результаты сведены в табл. 3 и рис. 2.

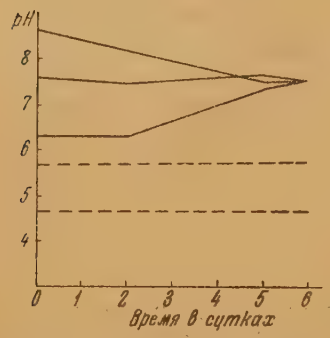


Рис. 2. Измерения pH по ходу брожения на средах с различным начальным pH

Из таблицы видно, что начальный pH = 4,7—5,7 совсем не допускает развития Bact. formicum; pH = 6,3 задерживает развитие — оно начинается только на третьи сутки; pH = 7,6 благоприятен для развития.

На рисунке хорошо заметно следующее явление: начальное значение pH = 7,6 остается постоянным в течение шести суток, но если мы берем начальный pH ниже этого значения, например 6,3, то по мере развития это значение изменяется в сторону повышения и доходит до 7,5; если начальный pH взят 8,6, мы наблюдаем падение значения pH до 7,5. Таким образом, какое бы значение pH мы ни взяли в пределах, допускающих развитие бактерий, конечный pH остается 7,5—7,6. Эти опыты проведены в трех повторностях; результаты близкие.

Это не совсем совпадает с данными Красиной, судя по таблицам которой pH остается постоянным во всех случаях (от pH = 7,0 до pH = 7,6). Однако, если pH изменяется при начальном щелочном значении его в сторону снижения, очевидно, среди продуктов брожения получается кислота. И можно было предположить, что здесь роль играет уксусная кислота, которая была обнаружена Омелянским и нами в предварительных опытах.

Для решения этого вопроса были проведены опыты с различным начальным pH среды и с определением сброженной муравьиной кислоты и образованной уксусной (табл. 4).

Из таблицы видно, что в случае начального высокого pH (8,5) значение его изменяется в сторону снижения, доходя до 7,6; в случае же более низких начальных pH = 7,3 и 6,5 происходит повышение его значения до 7,4—7,5. Таким образом, подтверждаются данные предыдущих опытов.

Таблица 4

Среда	pH	HCOOH мМ в 100 см³	CH_3COOH мМ в 100 см³	pH	HCOOH мМ в 100 см³	CH_3COOH мМ в 100 см³	pH	HCOOH мМ в 100 см³	CH_3COOH мМ в 100 см³
Исходная	8,5	42,4	—	7,3	42,4	—	6,5	42,4	—
Через 3 суток	8,1	39,2	1,2			0,0			0,0
» 4 »				7,5	38,0	0,0			0,0
» 6 »	7,6	32,6	2,1	7,5	29,8	0,2			0,0
» 10 »	7,6	19,4	4,5	7,5	20,4	4,0	7,4	25,0	2,6

Что касается образования уксусной кислоты, то таблица наглядно показывает, что при щелочном значении pH ее образование начинается на 3-и сутки и на 10-е сутки достигает значительной величины. При

начальном pH = 7,3 она появляется в среде только на 6-е сутки, и к концу опыта (10 дней) количество ее несколько меньше, чем в первом случае, и, наконец, при pH = 6,5 она долгое время совсем не образуется и только на 10-е сутки обнаруживается в половинном количестве по сравнению с первым вариантом. Особенно это ясно видно из табл. 5, где приведены проценты образованной уксусной кислоты от сброженной муравьиной на 6-й день и соответственно на 10-й день.

Таблица 5

Начальный pH	% уксусной кислоты от сброженной муравьиной на 6-е сутки	% уксусной кислоты от сброженной муравьиной на 10-е сутки
8,5	21,4	19,6
7,3	1,6	18,2
6,5	0,0	15,0

Даже при начальном pH = 6,5 к 10-м суткам образовалось некоторое количество уксусной кислоты. Однако надо помнить, что pH в этой среде к 10-му дню был уже 7,4.

Эти серии опытов были проведены в трех повторностях и дали очень близкие результаты. Если поддерживать pH среды на постоянном щелочном значении добавлением 0,1 *N* соды, получаются результаты, приводимые в табл. 6.

pH поддерживался здесь на 7,9. Брожение начиналось медленно, и лишь к концу третьих суток началось газовыделение. Развитие бактерий также отставало от такового на среде с pH = 7,5 (каковой pH надо считать оптимальным для развития). Это хорошо видно на рис. 3.

Образование же уксусной кислоты было интенсивным, и уксусная кислота составила 35,1% от сброженной муравьиной; такого высокого процента даже при более высоком начальном pH, но при возможности сдвига его в кислую сторону мы никогда не получали.

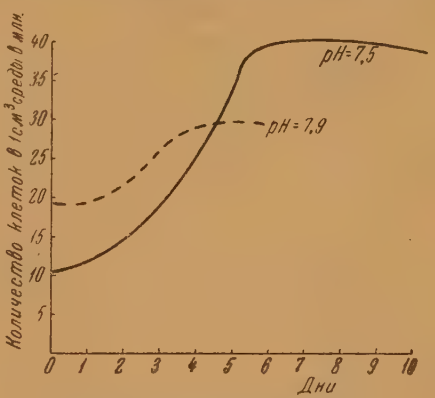


Рис. 3. Развитие бактерий при различном начальном pH

Очевидно, искусственное удерживание pH выше оптимального значения вызывало добавочное образование уксусной кислоты.

Таблица 6

Среда	pH	HCOOH мМ на 100 см³	CH_3COOH мМ на 100 см³	Число клеток в 1 см³
Исходная	7,9	37,4	0,00	$18 \cdot 10^6$
Через 4 суток . .	7,9	33,0	2,30	$29 \cdot 10^6$
» 6 » . .	7,9	25,6	4,14	$31 \cdot 10^6$

Приведенные данные дают возможность предположить, что образование уксусной кислоты является биологическим приспособлением для авторегулировки активной кислотности среды.

Как можно представить себе химизм образования уксусной кислоты при развитии Bact. formicum? Если принять приведенную выше формулу конструктивного обмена у Bact. formicum

$$HCOOH + H_2 = HCHO + H_2O$$

и если предположить, что формальдегида образовалось больше, чем его требуется для построения тела (либо благодаря тому, что его стало меньше потребляться, либо потому, что ферменты образовали его больше, чем нужно), можно представить себе конденсацию двух его молекул

$$HCHO + HCHO = CH_2OH \cdot CHO$$

с последующим сопряженным окислением — восстановлением:

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ CHO \end{matrix} + \begin{matrix} H_2 \\ \\ O \end{matrix} = CH_3COOH + H_2O$$

Таким образом, образование уксусной кислоты, возможно, как-то связано с повышением или понижением интенсивности конструктивного метаболизма.

Если, как мы видели, образование уксусной кислоты является фактором, вызывающим снижение pH в случае слишком высокого значения его, то естественно возникает вопрос, не будет ли она потребляться при кислой реакции среды. Для выяснения этого вопроса были проведены опыты на среде, состоящей из пептона, уксуснокислого кальция и фосфатов на водопроводной воде.

Развитие культуры шло медленно и только на 4-й день стало заметно помутнение среды, но газовыделения не было. Однако через 12 суток часть уксусной кислоты оказалась сброженной (табл. 7), и при этом pH среды несколько сдвинулся в щелочную сторону.

Таблица 7

Среда	pH	CH_3COOH мМ в 100 см³	Сброжено мМ	Продолжительность опыта
Исходная	6,5	28,5		
В конце опыта . . .	6,8	26,9	1,6	12 дней

При этом в среде была обнаружена в небольшом количестве нелетучая кислота (0,4—0,5 мМ на 100 см³ среды), ближе пока не определенная.

Таким образом, мы видим, что в известных условиях уксусная кислота может и потребляться.

Выводы

1. Была проведена работа по изучению обмена веществ у Bact. formicum на средах с муравьинокислыми солями в анаэробных условиях.
2. Установлена возможность хорошего развития Bact. formicum на синтетической среде, состоящей из муравьинокислого кальция, сернокислого аммония, фосфатов, биотина и тиамина (на водопроводной воде).

3. Таким образом выяснено, что муравьиная кислота может быть использована как для энергетического, так и для конструктивного метаболизма.

4. Изучено отношение Bact. formicum к pH среды. При этом выявлена способность культуры смещать активную кислотность среды, приближая ее к оптимальному для развития бактерий значению.

5. Установлено, что авторегуляция pH среды осуществляется за счет образования большего или меньшего количества уксусной кислоты.

Кафедра микробиологии
Московского государственного
университета

Получено 30.X.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Иерусалимский Н. Д. Ростовые вещества микробов, их природа и значение в жизни микроорганизмов (Обзор). Микробиология, IX, 740, 1940.
2. Иерусалимский Н. Д. Влияние ростовых веществ на ацетоно-этиловые бактерии. II. Отношение бактерий к биотину, тиамину и пара-амино-бензойной кислоте. Микробиология, XIV, 393, 1945.
3. Красина Н. Физиология бактерий, разлагающих муравьиную кислоту с образованием газа. Микробиология, V, 669, 1936.
4. Омелянский В. Über die Zersetzung der Ameisensäure durch Mikroben. Ctbl. Bakt., II, XI, 177, 1903.
5. Шапошников В. и Семенова В. Гетероферментативное молочнокислое брожение. Микробиология, XVIII, 1949.
6. Maassen A. Die organischen Säuren als Nährstoffe und ihre Zersetzbarkeit durch Bakterien. Arb. an dem Keis. Gesundheitsamt. XII, 340, 1896.
7. Stephenson M. and Stickland L. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of the enzyme. Biochem. J., XXV, 205, 1931.
8. Stephenson M. and Stickland L. The bacterial formation of methane by the reduction of one-carbon compounds by molecular hydrogen. Biochem. J., XXVII, 517, 1933.
9. Watterman H. Zur Physiologie der Essigbakterien. Ctbl. Bakt., Abt. II, 38, 451, 1913.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ОБРАСТАНИЯ КАМНЕЙ УГЛЕКИСЛЫМ КАЛЬЦИЕМ

Н. А. Красильников

В некоторых районах Армении наблюдается весьма интересное явление — «обрастание» камней углекислым кальцием. Крупные и мелкие камни различной породы покрываются более или менее толстым слоем извести. Слой этот различен — от едва заметного налета до 5—10 см толщины. Мы наблюдали в отдельных случаях камни, которые были покрыты слоем извести в 20 см. Нередко можно наблюдать очень мелкие камни в диаметре 0,2—1,0 см, замурованные в толстый известковый панцырь. Покрываются известью целые глыбы каменных пород (базальт, гранит, туф и пр.). Такие глыбы хорошо заметны в карьерах каменоломен.

При поперечном сечении хорошо заметно послойное отложение извести на поверхности камней (рис. 1), причем в некоторых случаях слоистость настолько хорошо выражена, что легко можно сосчитать число наслоений. Эти наслоения говорят о том, что отложение извести — процесс длительный, протекает в течение длительного ряда лет. Чем толще слой, тем он старше. В разные периоды времени процесс отложения происходит с различной скоростью, благодаря чему отдельные наслоения общего слоя имеют различную толщину.

Как правило, обрастание отдельных камней и целых глыб отмечается только в глубине почвы. Обнаженные каменные породы, никогда не бывшие покрытыми почвой, не имеют на поверхности отложения извести.

Описанное явление, как показали наши исследования, обусловлено биологическими факторами и в первую очередь микроорганизмами почвы.

При осмотре каменных пород в карьерах можно проследить последовательность отложения извести на поверхности каменных глыб. В трещинах, куда проникают корни растений, отложение углекислого кальция начинается вокруг корней. Получаются отчетливо обрисованные отпечатки последних (рис. 2). Они похожи на отпечатки, которые мы [3] наблюдали в некоторых черноземных почвах средней полосы Советского Союза. Чем моложе корни, тем меньше вокруг них слой углекислого кальция и тем тоньше отпечаток. У многолетних растений углекислый кальций вокруг корней отложен большим слоем; отпечаток более резко выражен (рис. 3). С каждым годом на одной и той же поверхности каменной глыбы вокруг корней наслаивается все больше и больше $CaCO_3$. В конечном итоге вся поверхность покрывается сплошным, более или менее толстым слоем извести (рис. 4). Последовательность отложения $CaCO_3$ вокруг корней растений и обрастание поверхности каменных глыб можно видеть из представленных нами рисунков.

Так же, как и в почве средней полосы Союза, здесь процесс отложения извести начинается с ризосферы, т. е. с поверхности корневой системы, где развиваются и концентрируются в большом количестве бактерии и другие микроорганизмы. Своей жизнедеятельностью они, если не полностью, то в значительной доле определяют описанное нами явление отложения углекислого кальция на поверхности камней. В пользу этого говорят следующие данные.

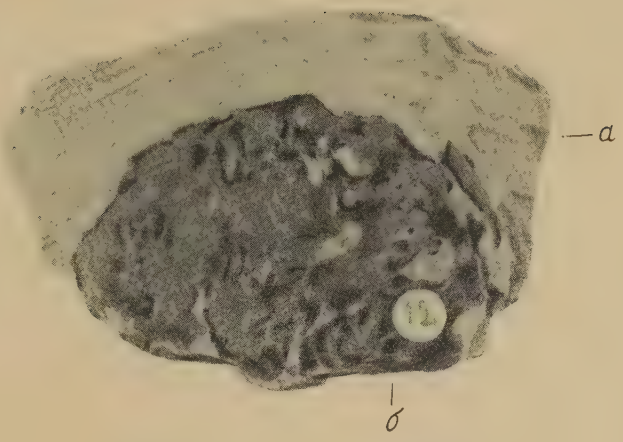


Рис. 1. Камень, „обросший“ углекислым кальцием. Поперечное сечение. а) Слой $CaCO_3$ в 5 см толщины, хорошо видна слоистость; б) основная порода камня. Уменьш. в 4 раза

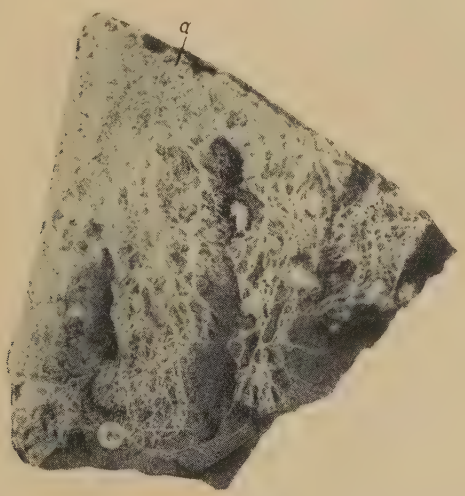


Рис. 2. Отложения углекислого кальция вокруг корневой системы однолетних растений (отпечаток на туфе). Увел. 1 : 1

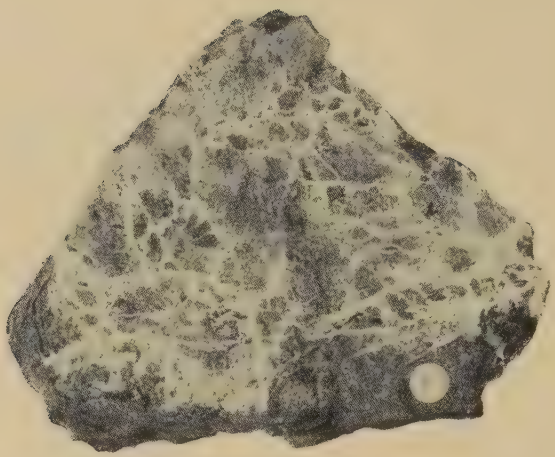


Рис. 3. Отложение углекислого кальция вокруг корней многолетних растений (отпечаток на поверхности туфа). Увелич. 1 : 1

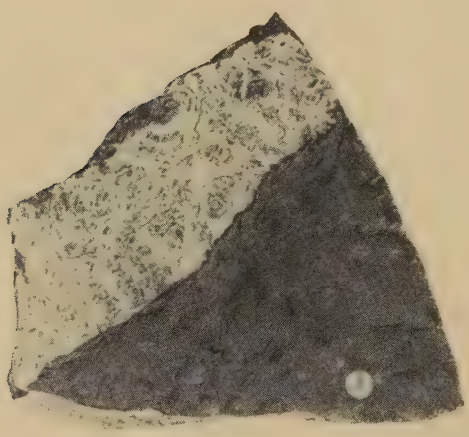


Рис. 4. Поверхность пластинки туфа, почти сплошь покрытой углекислым кальцием в результате многолетней деятельности прикорневой микрофлоры. Увел. 1 : 1.

В слое ризосферной извести при растворении его уксусной или соляной кислотой обнаруживаются в большом количестве клетки замурованных бактерий.

При высевах на питательные среды прикорневой почвы исследуемых объектов вырастает большое количество бактерий, которые энергично откладывают в субстрат углекислый кальций. Мы брали прикорневую почву из расщелин между глыбами каменных карьеров, где процесс отложения углекислого кальция вокруг корней достаточно четко выражен. Эту почву высевали на синтетическую среду Чапека и на МПА. Через 5—7 дней роста при 25° производился подсчет всех выросших на средах колоний и отдельно тех, вокруг которых происходило отложение солей кальция. В табл. 1 приведены цифровые данные подсчета трех серий опыта с образцами почв, собранными в различных местах Армении.

Таблица 1

Число микроорганизмов (в миллионах) в 1 г исследованной почвы

Почва	Всего бактерий	Бактерии, отложившие $CaCO_3$	Актиномицеты	
			всего	отложившие $CaCO_3$
Карьер близ Ботанического сада . .	1 250	175	1,3	0,15
» » Зоосада	1 650	145	7,0	0,25
На склоне горы Алагез	900	100	2,5	0,08
Долина близ реки Аракс	750	0,20	8,5	0,06

Как видно из таблицы, в ризосфере растений, растущих в расщелинах каменных глыб (базальта и туфа), общее число бактерий достаточно большое; среди них много обладающих способностью откладывать углекислый кальций. В ризосфере растений, растущих в долине (река Аракс), в наносных почвах число таких бактерий значительно меньше.

Не только бактерии, но и некоторые актиномицеты способны откладывать соли кальция в субстрат. Однако число их во много раз меньше, чем бактерий.

Чтобы выявить роль микроорганизмов в отложении $CaCO_3$ на поверхности камней в самой почве, был поставлен специальный опыт. Почва, взятая на склоне гор близ Еревана, помещалась в вегетационные сосуды 5 кг емкостью. В каждый сосуд внутрь почвы закладывались специально приготовленные из базальта и туфа плитки с совершенно чистой поверхностью. Сосуды во время опыта находились в лабораторном помещении. Через каждые 15—20 дней почва увлажнялась чистой дестиллированной водой (контрольные сосуды) и с примесью 0,5% сахарозы (опытные сосуды).

Опыт продолжался 10 месяцев. В конце опыта плитки вынимались из почвы и на их поверхности определялось отложение углекислого кальция. Кроме того, на протяжении всего опыта производились микробиологические анализы почв (три анализа) для установления степени развития микроорганизмов.

Эти опыты показали, что те плитки, которые находились в опытных сосудах, увлажняемых водой с сахарозой, были покрыты тонким налетом углекислого кальция; плитки в контрольных сосудах налета не

имели или имели в чрезвычайно малом количестве, в виде едва заметных следов.

Наличие сахара в данных опытах усилило и ускорило процесс отложения солей кальция на поверхности плиток. Отложения эти отмечались и на стенках сосудов. В природных условиях, надо полагать, роль сахара играют корневые выделения растений, благодаря чему отложение солей, как это было указано выше, происходит в первую очередь в ризосфере.

Микробиологический анализ почв показал, что в опытных сосудах абсолютное и процентное отношение бактерий, откладывающих соли кальция в субстрат, было значительно больше, чем в контрольных. В табл. 2 приведены средние данные анализов, произведенных с тремя повторностями каждого варианта опыта.

Таблица 2

Число бактерий и актиномицетов (в миллионах) в 1 г почвы

Почва в сосудах	Срок опыта в мес.	Бактерии		Актиномицеты	
		всего	откладывающие $CaCO_3$	всего	откладывающие $CaCO_3$
Опытных	3	1 800	0,85	0,30	0,01
	7	1 900	0,56	0,40	0.007
	10	2 100	0,65	0,47	0,015
Контрольных	3	0,25	0,008	0,10	0,006
	7	0,18	0,01	0,06	0,001
	10	0,38	0,02	0,09	0,002

Участие микроорганизмов в процессе отложения солей кальция в природных условиях мало изучено. Впервые на это обратил внимание Надсон [4]. В своих ранних исследованиях он экспериментально показал наличие связи между развитием определенных бактерий в чистых культурах и образованием кристаллов углекислого кальция. Значительно позднее Drew [6], Молиш [7] описали бактерий, отлагающих соли кальция в субстрат. Эти бактерии были выделены ими из морских и пресноводных водоемов. Брусов [5] наблюдал отложение кальция в оболочках некоторых бактерий. Калантарян и Петросян [2] выделили из озера Севан одну форму бактерий (B. sewanense), которая обладала способностью осаждать углекислый кальций из воды указанного водоема.

Весьма обстоятельные наблюдения и исследования Исаченко [1] показали, что роль микроорганизмов в отложении углекислого кальция в различных водоемах очень большая.

Тщательно проведенными опытами как в естественных условиях, так и в лабораторной обстановке с чистыми культурами бактерий были показаны механизм и последовательные стадии образования кристаллов углекислого кальция. В бактериальной слизи сначала появляется аморфный углекислый кальций в виде круглых телец различных размеров, от мелких едва заметных до крупных включений. Позднее аморфный $CaCO_3$ превращается в плотные кристаллические конгломераты, которые в некоторых случаях могут образовать большие скопления.

Исаченко выделил из озера Севан бактерий, которые энергично откладывают соли кальция на поверхность твердых тел. Автор приписывает этим бактериям явления массового обрастания камней на дне и у берегов указанного озера.

Отложение углекислого кальция бактериями, повидимому, происходит в основном одинаково как в чистых культурах, так и в водоемах и в почве. Там, где больше бактерий, отлагающих $CaCO_3$, и где жизнедеятельность их выше, там энергичнее происходит процесс выпадения кальция.

Приписывая микроорганизмам (бактериям, в меньшей степени актиномицетам, а возможно и другим микробам) роль биологического фактора обрастания камней в отмеченных выше местах Армении, следует подчеркнуть, что для этого явления требуются определенные условия. Процесс отложения кальция наблюдается только в определенных почвах и, возможно, в определенных местах залегания с установившимся определенным климатическим режимом (влажность, температура, аэрация, инсоляция и др.). В почвах, таких, как наносные в долинах рек, и других, отложение кальция на камнях не происходит. Это видно при осмотре древних сооружений, различных памятников, где разной породы камни на протяжении веков остаются чистыми от солей кальция.

Выводы

1. В некоторых районах Армении отмечается массовое явление обрастания $CaCO_3$ камней и целых каменных глыб различной породы (базальт, туф, гранит и другие).

2. Обрастание это имеет биогенный характер. В нем основным фактором являются микроорганизмы и в первую очередь бактерии, которые косвенно или непосредственно способствуют отложению $CaCO_3$ на поверхности скальных пород.

3. В условиях ризосферы растений отмечается обильное развитие указанных бактерий. Вследствие этого отложение $CaCO_3$ на горных каменистых породах происходит в первую очередь по ходу корней. Получаются хорошо заметные отпечатки на поверхности каменных глыб.

4. В условиях лабораторного эксперимента деятельность бактерий, отлагающих кальций, удается повысить прибавлением к почве сахаров, как источника углеродистого питания.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 5.X.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаченко Б. Л. О биогенном образовании карбоната кальция. Микробиология, XVII, 118, 1948.
2. Калантарян П. и Петросян А. Ueber ein neues kalkfällendes Bakterium aus den Sewan-see Bact. sewanense. Ctbl. Bakt., II, 85, 431, 1932.
3. Красильников Н А. Очаговое распространение микрофлоры в почве. Изв. АН СССР, серия биол., № 1, 193, 1936.
4. Надсон Г. Beitrag zur Kenntnis der bakteriogenen Kalkablagerungen. Arch. Hydrob., 19, 154, 1928.
5. Brussoff A. Ueber ein kalkspeicherendes Bakterium und die von ihm gebildeten «Kristalle». Arch. Microb., 4, 170, 1933.
6. Drew H. On the precipitation of calcium carbonate in the sea by marine Bacteria. Papers from the Tortudas Labor. of the Carnegie Inst. of Washington, 5, 7, 1914.
7. Molisch K. Ueber Kalkbakterien und andere kalkfällende Pilze. Ctbl. Bakt., II, 65, 130, 1925.

УЧАСТИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МИКСОБАКТЕРИЙ В ПРОЦЕССЕ ГУМИФИКАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОСТАТКОВ

II. О БИОХИМИЗМЕ ПРОЦЕССА ОБРАЗОВАНИЯ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

М. М. Кононова

В первом сообщении [3] изложены результаты исследования по биохимизму процесса разложения целлюлозы миксобактериями. Было установлено, что в этом процессе бо́льшая часть целлюлозы ($^3/_4$—$^2/_3$) минерализуется нацело, и только $^1/_4$—$^1/_3$ превращается в промежуточные продукты разложения и продукты ресинтеза целлюлозных миксобактерий. Образования гумусовых веществ при разложении целлюлозы чистыми культурами миксобактерий не наблюдалось, так же как и при автолизе плазмы последних. Вместе с тем при микроскопировании тканей растительных остатков на ранних стадиях их гумификации удавалось наблюдать образование гумусовых веществ, которое каким-то образом было связано с массовым развитием и последующим отмиранием миксобактерий.

Целью настоящей работы было изучение механизма этого процесса; оно было начато с изучения природы новообразованных гумусовых веществ.

1. Природа новообразованных гумусовых веществ

Гумусовые вещества выделялись из гумифицированных растительных остатков в виде водных растворов и осаждались с помощью 0,1 *N* H_2SO_4; бурый аморфный осадок освобождался от SO_4'' путем диализа в коллодийных мешочках и гель быстро высушивался на воздухе.

В полученных препаратах гумусовых веществ определялись: элементарный состав, функциональные группы, а также строение ароматического ядра (методом щелочной плавки с концентрированной КОН). Соответствующие данные приведены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, новообразованные гумусовые вещества, несмотря на некоторые колебания показателей элементарного состава и количества функциональных групп, имеют общий облик строения с почвенными гуминовыми кислотами; поэтому в дальнейшем изложении новообразованные гумусовые вещества называются нами гуминовыми кислотами из гумифицированных растительных остатков.

На основании данных табл. 1 можно предположить, что гуминовые кислоты из растительных остатков подобно почвенным гуминовым кислотам являются своеобразными веществами, образующимися при конденсации веществ ароматической природы с азотсодержащими органическими соединениями [1].

В связи с этим предположением возникает вопрос: каково происхождение компонентов, участвующих в образовании молекулы гуминовой кислоты, и какую роль в этом процессе играют целлюлозные миксобактерии?

---

[1] По последним данным Драгунова (2), в молекуле гуминовой кислоты присутствуют также и углеводные остатки.

Таблица 1

Сравнительные данные по элементарному составу и строению гуминовых кислот различного происхождения (в процентах на абсолютно сухое беззольное вещество)

Исследуемые гуминовые кислоты	C	H	O	N	OCH_3, исходных веществ	OCH_3, связан. с группами			Ароматическое ядро
						карбоксильными COOH	спиртовыми OH	фенольными OH	
Из гумифицированных листьев клевера . . .	57,04	5,65	32,35	4,95	2,40	8,70	7,56	6,26	Пирокатин и протокатеховая кислота
Из корней клевера . .	55,88	5,56	34,63	3,93					—
Из подзолистой почвы Московской области *. .	57,94	5,79	31,41	4,86	1,54	8,46	3,37	3,35	Протокатеховая кислота
Из черноземной почвы Курской области * . .	57,32	4,25	34,39	4,04	1,17	9,01	2,11	4,77	Трехатомный фенол (флороглюцин вторичного происхождения)

* По данным С. С. Драгунова, Н. Н. Желохонцевой и Е. И. Стрелковой, «Сравнительное исследование почвенных и торфяных гуминовых кислот» (Почвоведение, № 7, 1938).

По общепринятым взглядам, наличие в гуминовых кислотах ароматических соединений типа полифенолов является одним из главных аргументов в пользу лигнинной теории происхождения гуминовых кислот. Так, согласно представлению Ваксмана о лигнопротеиновом комплексе, как о ядре гумуса, это «комплексное» соединение образуется при взаимодействии лигнина растительных остатков с протеинами тел бактерий, участвующих в процессе гумификации.

Однако, как указывалось в первом сообщении, в наших исследованиях образование гуминовых кислот имело место в ранние стадии гумификации растительных остатков, когда лигнифицированные ткани еще оставались неразложившимися. Очевидно, в данном случае в образовании гуминовых кислот участвуют какие-то иные ароматические соединения типа полифенолов, не лигнинного происхождения.

Одним из возможных источников последних могут являться дубильные вещества, значение которых в образовании гуминовых кислот на ранних стадиях гумификации растительных остатков отмечал Трусов [8].

Однако не исключена возможность, что группа растворимых полифенолов, помимо дубильных веществ, содержит и другие полифенолы, как, например, растворимые полифенолы, участвующие в дыхании клеток («дыхательные хромогены» Палладина), а также в соответствии с современными взглядами на природу и происхождение лигнина полифенолы — так называемые «предшественники» лигнина (Hibbert [10]).

Что касается второго компонента, участвующего в реакции конденсации при образовании молекулы гуминовой кислоты,— азотсодержащих органических соединений, то в соответствии с микроскопическими наблюдениями одним из возможных источников их могут служить продукты распада тел целлюлозных миксобактерий.

Дальнейшими исследованиями было установлено, что эта группа бактерий участвует не только как один из компонентов в образовании молекулы гуминовой кислоты, но и как биокатализатор в реакции конденсации полифенолов с азотсодержащими органическими соединениями; это последнее свойство обязано наличию у миксобактерий окислительных ферментов (пероксидазы и, повидимому, полифенолоксидазы).

К изложению результатов исследования по этому вопросу мы и переходим.

2. О возможном участии окислительных ферментов в образовании гуминовых кислот

Указание на большую роль экзоферментов бактерий в синтезе гумусовых веществ имеется у Вильямса [1]. По мнению Трусова [8], окисление полифенолов (дубильных веществ) и дальнейшая их конденсация, имеющие место при образовании гуминовых кислот, происходят при участии окислительных ферментов разлагающихся растительных тканей и микрофлоры, присутствующей в последних.

Однако эта интереснейшая идея, высказанная на основании лишь общих соображений о возможных путях окисления и конденсации полифенолов, не была подкреплена конкретными экспериментальными данными ни в исследованиях Трусова, ни в дальнейших работах других авторов, также указывающих на значение оксидаз в образовании гумусовых веществ (например, Maiwald [12], Мишустин [7]). Поэтому до сих пор указание на роль ферментов в гумусообразовании носит лишь общий характер, а реакция окисления, конденсации и полимеризации, которым обязано образование гуминовых кислот, считаются чисто физико-химическими.

Между тем современные работы по окислительным ферментам и их участию в разнообразных реакциях окисления и последующей конденсации ароматических соединений представляют большой интерес и для изучения процессов образования гумусовых веществ. Таковы работы Манской [5], которая установила, что окисление пирокатехина кислородом воздуха значительно активизируется при добавлении фермента пероксидазы, причем образуются конденсированные бурые продукты окисления. Аналогичный процесс ею наблюдался при окислении пероксидазой чайного таннина и спиртовых экстрактов из дубовой стружки [6].

Весьма интересны работы Курсанова и его сотрудников [4] по изучению природы и происхождения чайных таннинов. Образование конденсированных дубильных веществ при завяливании зеленого листа ими объясняется как результат ферментативного окисления простых катехинов, в которых появляются ортохинонные или перекисные группы, склонные к дальнейшей конденсации с другой молекулой катехина, благодаря свойству этих групп акцептировать водород соседней молекулы.

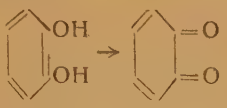
Результаты указанных работ позволяют конкретизировать представление о возможном участии оксидаз в образовании гуминовых кислот. Если представить в соответствии с современными взглядами, что первичная молекула гуминовой кислоты образуется при конденсации азотсодержащего органического вещества с ароматическим соединением типа полифенолов, то в среде, где находятся эти компоненты, в присутствии окислительных ферментов реакция может происходить следующим образом: 1-я фаза — ферментативное окисление молекулы полифенола с образованием хинонных групп; 2-я фаза — конденсация хинона с азотсодержащим соединением.

Принимая во внимание одну из возможных схем образования ду-

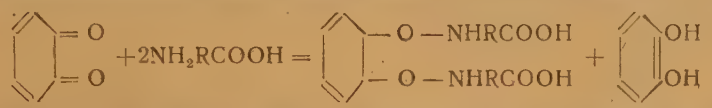
бильно-белковых соединений, можно предположить, что конденсация произойдет по месту расположения хинонных групп (Theis [14]).

Так, для пирокатехина и протеина эту реакцию схематично можно представить следующим образом:

I. Окисление пирокатехина ферментативным путем, с образованием хинонных групп



II. Конденсация одной молекулы хинона с протеином, сопровождающаяся одновременным восстановлением второй молекулы хинона



Несомненно, что образование молекулы гуминовой кислоты имеет более сложный характер, а потому приведенная схема нами рассматривается лишь как основа процесса.

Обратимся теперь к объекту наших исследований — целлюлозным миксобактериям.

В опытах с разложением целлюлозы чистыми культурами этих бактерий в жидкой среде Гётчинсона уже на 5—6-й день обнаруживаются окислительные ферменты (пероксидаза и, повидимому, полифенолоксидаза), активность которых возрастает примерно до 20—25-дневного возраста и падает в более старых культурах. Нами проведен ряд опытов, имевших целью выявить значение окислительных ферментов целлюлозных миксобактерий в образовании гуминовых кислот.

Опыт № 1. Определение активности оксидаз целлюлозных миксобактерий

Предварительно ставились опыты с разложением целлюлозы чистой культурой Sorangium cellulosum в жидкой среде Гётчинсона. По истечении определенного срока культуральная жидкость отфильтровывалась через бумажный фильтр и центрифугировалась.

Затем готовилась смесь следующего состава: 1% пирогаллола — 2 мл, фосфатного буфера pH = 5,9 — 2 мл, культуральной жидкости — 2 мл, 11% H_2O_2 — 0,5 мл.

В контрольных опытах культуральная жидкость инактивировалась 10-минутным прогреванием в кипящей воде. В некоторых опытах были поставлены две серии: с H_2O_2 (для определения активности пероксидазы) и без H_2O_2 (для обнаружения присутствия полифенолоксидазы).

Таблица 2

Окисление пирогаллола окислительными ферментами целлюлозных миксобактерий

Возраст культуры	Время опыта					
	Начальн.	30 мин.	1 час	2 часа	3 часа	4 часа
6 дней + H_2O_2	100	200	464	678	678	678
6 » — H_2O_2	100				150	150
13 » + H_2O_2	100	250	570	845	970	810
13 » — H_2O_2						
20 » + H_2O_2	100	200	550	850	900	850
20 » — H_2O_2	100				130	150
27 » + H_2O_2	100	200	280	400	500	500
27 » — H_2O_2	100				150	170

Пробирки со смесями ставились в термостат при 28—30°, и через определенные промежутки времени колориметрированием определялось изменение цвета (побурение) пирогаллола, вызванное его ферментативным окислением. Контролем являлась смесь без H_2O_2, которая во время проведения опыта выдерживалась при 0°.

Приведенные в табл. 2 данные явно указывают на присутствие в культуральной жидкости окислительных ферментов. Наиболее высокая активность пероксидазы отмечается в 2—3-недельных культурах целлюлозных миксобактерий, в более старых культурах она снижается.

Повидимому, целлюлозные миксобактерии, помимо пероксидазы, имеют и полифенолоксидазу, так как некоторое окисление пирогаллола происходит и без H_2O_2; однако, благодаря слабой вымываемости полифенолоксидазы из клеток бактерий, обнаружить этот фермент в культуральной жидкости труднее, чем пероксидазу.

Опыт № 2. Окисление различных полифенолов пероксидазой целлюлозных миксобактерий

В опыте № 2 испытывалось окисление различных полифенолов: пирогаллола, пирокатехина, гидрохинона, галловой кислоты, флороглюцина, гваякола и резорцина (рис. 1).

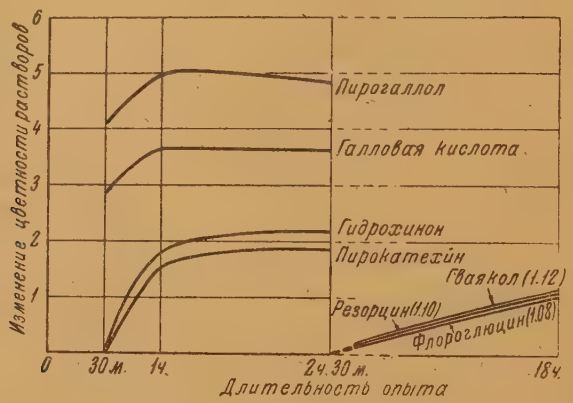


Рис. 1. Окисление различных ароматических соединений пероксидазой целлюлозных миксобактерий

Условия постановки опыта те же, что и в опыте № 1.

Данные этого опыта показывают, что интенсивно окислялись первые четыре полифенола (пирогаллол, пирокатехин, гидрохинон, галловая кислота) и очень слабо три остальных (флороглюцин, гваякол и резорцин). Эти данные представляют несомненный интерес.

Дело в том, что полифенолы первой группы по характеру расположения фенольных гидроксилов (OH) склонны к образованию орто- или парахинонов, в то время как флороглюцин и резорцин имеют группы (OH) в метаположении, для которых хиноны неизвестны.

Что касается гваякола, то хотя у него группы (OH) находятся в ортоположении, но одна из групп замещена метоксильной группой (OCH_3), вследствие чего образование хинона возможно лишь после деметилирования.

Результаты этого опыта указывают на своеобразную «избирательную способность» пероксидазы целлюлозных миксобактерий по отношению к фенолам, легко образующим орто- и парахиноны, что находится в полном соответствии с высказанными выше соображениями о

возможном пути ферментативного окисления полифенолов и последующей конденсации их с протеинами.

Установив наличие оксидаз в среде с целлюлозными миксобактериями, мы попытались воспроизвести ферментативным путем процесс конденсации полифенола с протеином.

Опыт № 3. Конденсация пирогаллола с растворимым пептоном при участии окислительных ферментов целлюлозных миксобактерий

Для опытов готовились смеси следующего состава: пирогаллол — 1 г (растворенный в 15 мл H_2O); пептон 0,5 г (растворенный в 30 мл H_2O); фосфатный буфер pH = 5,9 — 10 мл; культуральная жидкость целлюлозных миксобактерий — 10 мл; 1% H_2O_2 — 2 мл.

В контрольных вариантах та же смесь с инактивированной культуральной жидкостью.

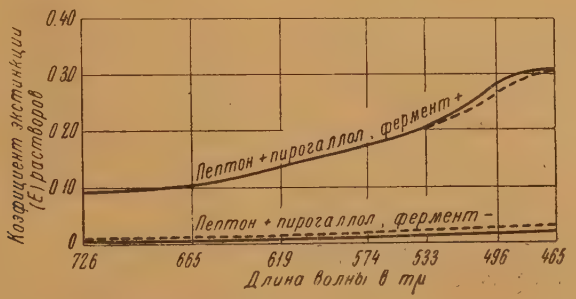


Рис. 2. Абсорбция (ослабление) света растворами конденсатов (пептон + пирогаллол)

Колбочки со смесями ставились в термостат при 28—30° на 18 часов. За это время смесь с неинактивированным ферментом сильно мутнела и бурела; в контрольных колбах с инактивированной жидкостью вид смеси изменялся незначительно. От прибавления нескольких капель 10% H_2SO_4 выпадал бурый аморфный осадок, обильный в опытных колбах, незначительный в контрольных. После кратковременного нагревания на водяной бане осадок отделялся центрифугированием, далее отмывался от непрореагировавших реактивов и растворялся в 0,1 *N* NaOH. При прибавлении к щелочному раствору 1*N* H_2SO_4 осаждался темнобурый гель, который отмывался от SO_4'' водой; затем подготовленные препараты растворялись в одинаковом объеме 0,1 *N* Na_2CO_3 и растворы просматривались в фотометре типа Пульфриха.

Результаты измерений представлены в значениях коэффициента экстинкции *E*, которые характеризуют абсорбцию (ослабление) света в различных частях спектра испытуемыми растворами.

Как можно видеть из данных рис. 2, значения коэффициента экстинкции *E* весьма низки в том случае, когда взаимодействие пептона и пирогаллола происходило в отсутствие ферментов (инактивированная культуральная жидкость). Наоборот, в случае присутствия ферментов (неинактивированная культуральная жидкость) реакция конденсации шла весьма интенсивно, в соответствии с чем растворы полученных препаратов обнаруживали значительную способность к абсорбции (ослаблению) света в различных частях спектра. Аналогичные результаты были получены при замене пептона на желатину, альбумин; однако при замене пептона на гликоколь реакция шла очень слабо.

В следующем опыте № 4 пептон был заменен продуктами распада плазмы целлюлозных миксобактерий. Опыт был поставлен, исходя из

высказанного выше предположения о возможном участии плазмы миксобактерий как одного из компонентов — протеина при реакции конденсации. Это предположение вполне допустимо, так как, по нашим анализам, плазма целлюлозных миксобактерий содержит до 75% белков (процент N равен 12,0).

Опыт № 4. Конденсация пирогаллола с продуктами распада плазмы целлюлозных миксобактерий

Продукты распада плазмы целлюлозных миксобактерий получались следующим образом.

Слизистая бактериальная масса снималась с поверхности чашек Петри с твердой крахмально-аммиачной средой, размазывалась тонким слоем на поверхности стекла, быстро высушивалась на воздухе и растиралась в порошок.

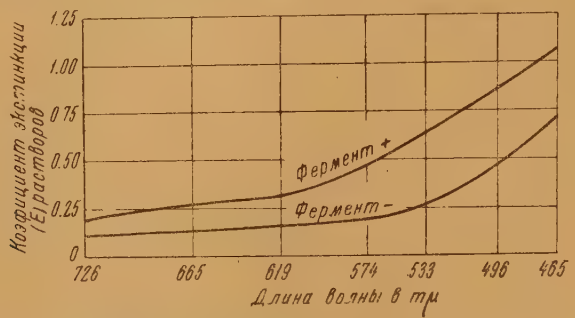


Рис. 3. Абсорбция (ослабление) света растворами конденсатов (пирогаллол + продукты распада плазмы целлюлозных миксобактерий)

Навеска в 1 г этого сухого вещества увлажнялась водой и в присутствии толуола выдерживалась в термостате при 40°. Через сутки смесь разбавлялась некоторым количеством воды, взбалтывалась и центрифугировалась. Затем опалесцирующая жидкость сливалась с осадка и бралась вместо раствора пептона. В остальном постановка опыта была аналогичной опыту № 3.

В этом опыте с заменой пептона продуктами распада плазмы целлюлозных миксобактерий было также установлено образование конденсированных продуктов.

Как можно видеть из рис. 3, при прибавлении содержащей ферменты неинактивированной культуральной жидкости реакция шла значительно интенсивнее, показателем чего являются более высокие значения коэффициента экстинкции E, характеризующие величину абсорбции (ослабление) света растворами образовавшихся конденсатов.

Приведенные в настоящем сообщении материалы, как нам кажется, в известной мере объясняют участие целлюлозных миксобактерий в образовании гуминовых кислот на ранних стадиях гумификации растительных остатков. Если представить себе, что первичная молекула гуминовой кислоты образуется при конденсации полифенола и азотсодержащего органического соединения, то целлюлозные миксобактерии в этом процессе участвуют двояким образом:

1) продукты распада их плазмы являются одним из реагирующих компонентов — протеинами;

2) окислительные ферменты целлюлозных миксобактерий (пероксидаза и, возможно, полифенолоксидаза) выполняют в этой реакции роль биокатализаторов.

Однако, как видно из приведенных материалов, образование гуминовых кислот не может рассматриваться только как результат разло-

жения целлюлозы миксобактериями, так как в образовании первичной молекулы гуминовой кислоты на этой стадии гумификации участвуют и другие компоненты растительных тканей — растворимые полифенолы.

Таким образом, правильное представление об участии целлюлозы и разлагающих ее миксобактерий можно иметь лишь тогда, когда изучаемый процесс рассматривается в системе других явлений, происходящих при гумификации растительных остатков.

Последнее мы попытаемся сделать в заключительном разделе сообщения.

Обсуждение полученных результатов

Обратимся к вопросу, разрешение которого являлось нашей задачей: какова роль целлюлозных миксобактерий в цепи сложных изменений, которым подвергаются растительные остатки в процессе гумификации?

Как видно из приведенных в первом сообщении материалов, с массовым появлением в тканях целлюлозных миксобактерий связан этап или стадия гумификации растительных остатков, занимающая место после развития разнообразной сапрофитной микрофлоры (использующей наиболее доступную часть органических азотсодержащих соединений и углеводных компонентов), но до разложения наиболее устойчивой части — лигнифицированных тканей.

С деятельностью целлюлозных миксобактерий связано разложение большей части целлюлозных стенок живых тканей. В этом процессе целлюлоза разлагается почти нацело, если не считать некоторого количества низкомолекулярных органических кислот, а также продуктов ресинтеза в форме бактериальной плазмы (протеинов и полиуронидов).

Поэтому, если рассматривать этот процесс изолированно, то участие целлюлозы и целлюлозных миксобактерий в образовании гумусовых веществ ничтожно.

Однако процесс происходит в системе тканей, где продукты распада целлюлозы и продукты ресинтеза целлюлозных миксобактерий могут вступать во взаимодействие с другими компонентами тканей. В работе показано, что продукты распада плазмы целлюлозных миксобактерий являются одним из компонентов, участвующих в синтезе молекулы гуминовой кислоты,— источником протеинов; другим компонентом являются растворимые полифенолы различного происхождения, в том числе дубильные вещества.

Вместе с тем целлюлозные миксобактерии выступают также в важной и ответственной роли как биокатализаторы, так как выделяемые ими в среду окислительные ферменты (пероксидаза, а также, возможно, полифенолоксидаза) активизируют реакцию конденсации протеинов с полифенолами, являющуюся основой синтеза первичной молекулы гуминовой кислоты.

Образование гуминовых кислот в растительных остатках не ограничивается только этой стадией гумификации. Несомненно, что аналогичная реакция может повторяться при гумификации растительных остатков многократно и при разложении других компонентов тканей. Так, на более поздних стадиях гумификации растительных остатков в образовании гуминовых кислот участвуют лигнифицированные ткани, однако лишь после предварительного разложения их до растворимых полифенолов; последние также могут подвергаться действию окислительных ферментов, выделяемых другими организмами, и далее вступают во взаимодействие с присутствующими в среде протеинами.

Большой интерес представляет ряд работ Beijerinck [9], Lemoigne [11], Raistric [13], в которых установлено образование полифенолов при разложении белков и разнообразных углеводов плесневыми грибами и бактериями, а также присутствие ароматических соединений в

плазме микроорганизмов. Образование гуминовых кислот при участии этой группы соединений также вполне допустимо.

Таким образом, происхождение полифенолов и протеинов, как компонентов для синтеза гуминовых кислот, может быть самым разнообразным, так же как и окислительные ферменты могут выделяться различными микроорганизмами (плесневыми грибами, актиномицетами, целлюлозными миксобактериями и др.). Этим и объясняется тот важный факт, что, несмотря на различное происхождение разнообразных почвенных гуминовых кислот, общий облик строения и сходство их химической природы и свойств отображают единый путь образования этой специфической группы почвенных органических веществ.

Работы по гумусообразованию в указанном выше направлении нами продолжаются.

Выводы.

1. Изложенные материалы приводят к выводу, что целлюлоза является косвенным источником гумусовых веществ.

2. Гуминовые кислоты, образующиеся в растительных остатках на стадии интенсивного распада целлюлозы, обязаны происхождением взаимодействию азотсодержащих органических соединений (элементов плазмы миксобактерий) с растворимыми полифенолами (дубильные вещества, полифенолы — предшественники лигнина, полифенолы — вторичного происхождения).

3. Взаимодействие указанных компонентов происходит при участии окислительных ферментов целлюлозных миксобактерий. Автором дается примерная схема процесса синтеза первичной молекулы гуминовой кислоты.

Почвенный институт
Академии Наук СССР
Москва

Получено 20.VII.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Вильямс В. Р. Почвоведение. Сельхозгиз, 1939.
2. Драгунов С. С., Желаховцева Н. Н. и Стрелкова Е. И. Сравнительное исследование почвенных и торфяных гуминовых кислот. Почвоведение, № 7, 1948.
3. Кононова М. М. и Александрова И. В. Участие целлюлозных миксобактерий в процессе гумификации растительных остатков. I. О биохимизме процесса разложения целлюлозы миксобактериями. Микробиология, XVIII, 42, 1949.
4. Курсанов А. Л., Джемухадзе К. и Запрометов М. Конденсация катехинов чайного листа при окислении. Биохимия, 12, вып. 5, 1947.
5. Манская С. М. и Емельянова М. П. Окисление пирокатехина пероксидазой. Биохимия, 5, вып. 4, 1940.
6. Манская С. М. Образование лигнина в растении. Успехи современной биологии, 23, вып. 2, 1947.
7. Мишустин Е. Н. и Подъяпольская О. П. Образование гумусовых соединений при процессах автолиза. Микробиология, VII, 198, 1938.
8. Трусов А. Материалы к изучению почвенного гумуса, ч. 1. Процессы образования «гуминовой кислоты». Материалы по изучению русских почв, вып. 26—27, 1917.
9. Beijerinck M. Ueber Chinonbildung durch Streptothrix-chromogena u. Lebensweise dieses Mikrobs. Ctbl. Bakt., 2. Abt., VI, 2, 1900.
10. Hibbert H. Lignin. Ann. Rev. Biochem., XI, 1942.
11. Lemoigne M. Formation d'un orthodiphenol aux dépens des glucides par certains microbes du sol. C. R., 186, 473, 1928.
12. Maiwald K. Organische Bestandteile des Bodens. Handb. Bodenlehre. Blank. 7, 1931.
13. Raistric H. Studies in the biochemistry of microorganisms. Biochem. J., 25, 1931; 27, 1933; 35, 1941.
14. Theis E. Studies in vegetable tanning. II. The Journ. of the Amer. Leather Chenists Ass., XL, No. 4, 1945.

МИКРОБИОЛОГИЯ ЧЕРНОГО МОРЯ

РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДНОЙ ТОЛЩЕ ЧЕРНОГО МОРЯ

А. Е. Крисс и Е. А. Рукина

Согласно господствующим представлениям, водная масса Черного моря должна быть разделена по вертикали на два слоя неодинаковой толщины. Верхний, узкий слой, содержащий кислород, простирается от поверхности моря до глубины 125—225 м; нижний слой, зараженный сероводородом, в глубоководной части моря имеет в ряде мест толщину, превышающую 2 000 м. Принято считать, что в силу своеобразного распределения солености и плотности воды в Черном море обмен между этими зонами затруднен, он происходит только за счет процесса диффузии и поднятия вод низвергающейся из Босфора более соленой среднеземноморской водой. Сероводородная область моря находится в состоянии стагнации, полного покоя, тогда как в кислородной зоне происходит перемешивание в результате термической конвекции. Эти гидрологические различия в строении водного массива Черного моря накладывают свой отпечаток на гидрохимию и гидробиологию черноморского бассейна, что проявляется в необычном для морей распределении химических соединений и форм жизни. Полагают, что в сероводородной зоне из организмов возможно лишь существование анаэробных бактерий; в ней накапливаются в большом числе только продукты восстановительных реакций.

Новая точка зрения по основному вопросу гидрологии Черного моря — обмену между поверхностными и глубинными слоями воды — высказывается в работах Водяницкого [1, 2]. Автор выдвинул гипотезу о непрерывно происходящем процессе опускания поверхностных слоев на периферии кольцевых течений в Черном море и подъеме глубинных слоев в их центральных частях благодаря вращательной силе этих течений, следствием чего является перемешивание воды до больших глубин — 1 000 м. Ниже 1 000 м и до дна движение воды обусловлено термической конвекцией. Эта плодотворная гипотеза позволяет объяснить ход кривой вертикального распределения ряда химических веществ в Черном море, а также описанные случаи (Крисс и Рукина [11]) широкого распространения некоторых бактериофагов в толще воды глубоководной области моря.

Особенности гидрологического режима, гидрохимии и гидробиологии Черного моря не могли не привлечь внимания микробиологов. Начатые Зелинским и Брусиловским [4, 5] и получившие затем наиболее полное выражение в трудах Исаченко и его сотрудников [6, 7, 8], проведенные микробиологические исследования дали общие представления о наличии в Черном море физиологических групп микроорганизмов, участвующих в круговороте биогенных элементов.

В настоящее время становится очевидной необходимость углубленного изучения микробиологии Черного моря. Вопросы заселенности Черного моря микроорганизмами, состава микробных ценозов, роли микроорганизмов в превращениях органического вещества и неорганических соединений приобретают сейчас не только общемикробиологический ин-

терес, но имеют непосредственное значение для решения многих проблем гидрологии, гидрохимии и гидробиологии Черного моря.

Первая попытка более или менее подробно выяснить характер распределения микробного населения в водной толще Черного моря была сделана во время работ Черноморской комплексной экспедиции в 1946 г. Авторы настоящей статьи стремились собрать материал, который позволил бы составить суждение о распространении микроорганизмов в открытой части моря, на большом удалении от берегов, т. е. вне существенного влияния прибрежной зоны суши. Разрез в восточной части моря, сделанный Черноморской экспедицией, дал возможность распределить пять микробиологических станций таким образом, чтобы они приходились на значительном расстоянии от берегов, располагались над максимальными глубинами Черного моря и захватывали периферию и центральные участки халистатической области. Расстояние от первой станции до ближайшего берега составляло 110 км, а глубина моря в этом месте равнялась 2 240 м, второй станции — 150 км, глубина — 2 164 м, третьей станции — 170 км, глубина — 2 150 м, четвертой станции — 125 км, глубина — 2 100 м, пятой станции — 100 км, глубина — 1 730 м. Расстояние между станциями составляло 50 км.

Методика

Пробы воды для микробиологических исследований на всех станциях извлекались до глубины 250 м по горизонтам: 1, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 м. Начиная с 250 м, пробы воды брались по горизонтам: 500, 750, 1 000, 1 250, 1 500, 1 750, 2 000 м. Взятие образцов грунта производилось трубкой Экмана на 2, 3, 4 и 5-й станциях,— исследовались только поверхностные слои илов.

Следует здесь отметить в соответствии с данными Гурфейн [3], что предложенные микробиологами приборы для взятия проб воды оказались непригодными для работы на больших глубинах.

Мы пользовались батометрами Кнудсена для извлечения проб воды с больших глубин. Наполненные батометры переносились в оборудованную на судне лабораторию, где вначале хорошо прожигался кран батометра, затем сливалось несколько десятков миллилитров воды для охлаждения и промывания его, и только после этого заполнялась стерильная пробирка пробой воды для микробиологических исследований.

На двух станциях, 2-й микробиологической и 9-й гидрологической, были взяты пробы из улова планктона, собранного с помощью сети Джеди малая, ячейка которой имела диаметр в 60 μ. На второй станции этой сеткой был обловлен слой 25—0 м, на девятой — следующие слои: 400—250 м, 150—125 м, 125—100 м, 100—75 м, 75—50 м, 50—25 м, 25—10 м. Часть содержимого стаканчика после фламбирования крана сливалась в стерильную посуду.

Пробы воды, взятые из уловов планктона, а также образцы илов тотчас же засевались в судовой лаборатории на рыбопептонный агар, приготовленный на морской воде. Вода засевалась в количестве 0,1, 0,25 и 0,5 мл, улов планктона — в количестве 0,1 мл, разведения его 1 : 10, а ил — по 0,1 мл разведений 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}. Разведения делались на стерильной морской воде. Пробы наносились на поверхность налитого в чашки Петри и неподсушенного рыбопептонного агара и там растирались. Чтобы исключить возможность освобождения большого количества воды при застывании агаровой среды, последняя разливалась слегка теплой в нагретые чашки Петри. Посевы воды и илов выдерживались в течение 5 дней при 22—25°, после чего сосчитывалось общее число выросших колоний микроорганизмов. Вслед за общим подсчетом производилась отвивка различающихся колоний в пробирки со скошен-

ным рыбопептонным агаром. При этом учитывалась численность отвиваемых форм и описывались их культуральные признаки.

Таким образом была получена коллекция штаммов микроорганизмов, насчитывающая около 300 культур и характеризующая собой микробное население на различных глубинах в исследованных районах Черного моря.

Все штаммы были детально изучены в целях видовой идентификации их. Для выявления морфологических и культуральных особенностей и физиологических свойств этих штаммов применялся целый ряд сред. Поскольку полученные штаммы микроорганизмов были выделены не только из кислородной, но и из сероводородной зоны Черного моря, проведение специальных опытов имело своей задачей выяснить способность их развиваться в отсутствие свободного кислорода. Производился посев каждого штамма в пробирки с мясопептонным бульоном. Часть пробирок устанавливалась под колокол и выдерживалась при 28° в условиях вакуума, другая часть пробирок — контрольная — с доступом воздуха. Наблюдения продолжались длительный срок, до 3 недель.

По мере того как подвигалось вперед изучение морфологии, культуральных признаков и физиологических свойств выделенных культур, оказывалось возможным сопоставление их и идентификация в пределах каждой систематической группы. В результате сопоставления на основе всех изученных признаков удалось без труда сгруппировать штаммы, не различающиеся между собой, и составить, таким образом, представление о распространенности данных микроорганизмов в Черном море.

Количественное распределение микроорганизмов в водной толще Черного моря

Рис. 1 дает представление о количественном распределении микроорганизмов на различных горизонтах водной массы в кислородной и сероводородной зонах, на дне моря, а также о числе микробов, обнаруженных в уловах планктона. Цифры на рис. 1 выражают число колоний в пересчете на 1 мл воды или улова планктона, или на 1 г невысушенного ила.

Эти цифры можно рассматривать лишь в относительном значении их, так как метод счета колоний позволяет судить только в приближенном виде об истинном числе живых микробных особей в исследуемых образцах. Мы уже указывали (Крисс [10]), что такие факторы, как явления антагонизма в условиях ограниченного пространства чашки Петри, затем трудности изолирования клеток друг от друга при посевах, т. е. получения колоний из одиночных клеток, понижают абсолютное значение цифр, выражающих количество микроорганизмов по числу выросших колоний. Не учитываются методом счета колоний, кроме прототрофов (на органических средах) и строгих анаэробов, также бактериальные формы, которые не приспособлены к культивированию в необычных для их существования условиях, создаваемых в лаборатории. Но этот метод незаменим на современном уровне развития методов микробиологических исследований, при необходимости определения количественных соотношений отдельных групп или видов микроорганизмов, составляющих микробные ценозы в изучаемой экологической обстановке.

При рассмотрении рис. 1 становится очевидным существование двух сфер в Черном море, где наблюдается относительный расцвет микробиальной жизни: планктона и поверхности дна моря.

На 2-й микробиологической и 9-й гидрологической станциях, где брались пробы воды из уловов планктона, число микроорганизмов в 1 мл содержимого стаканчика колебалось в пределах от 2 500 до 14 000. Нельзя не признать эти числа высокими, если сравнить их с числами,

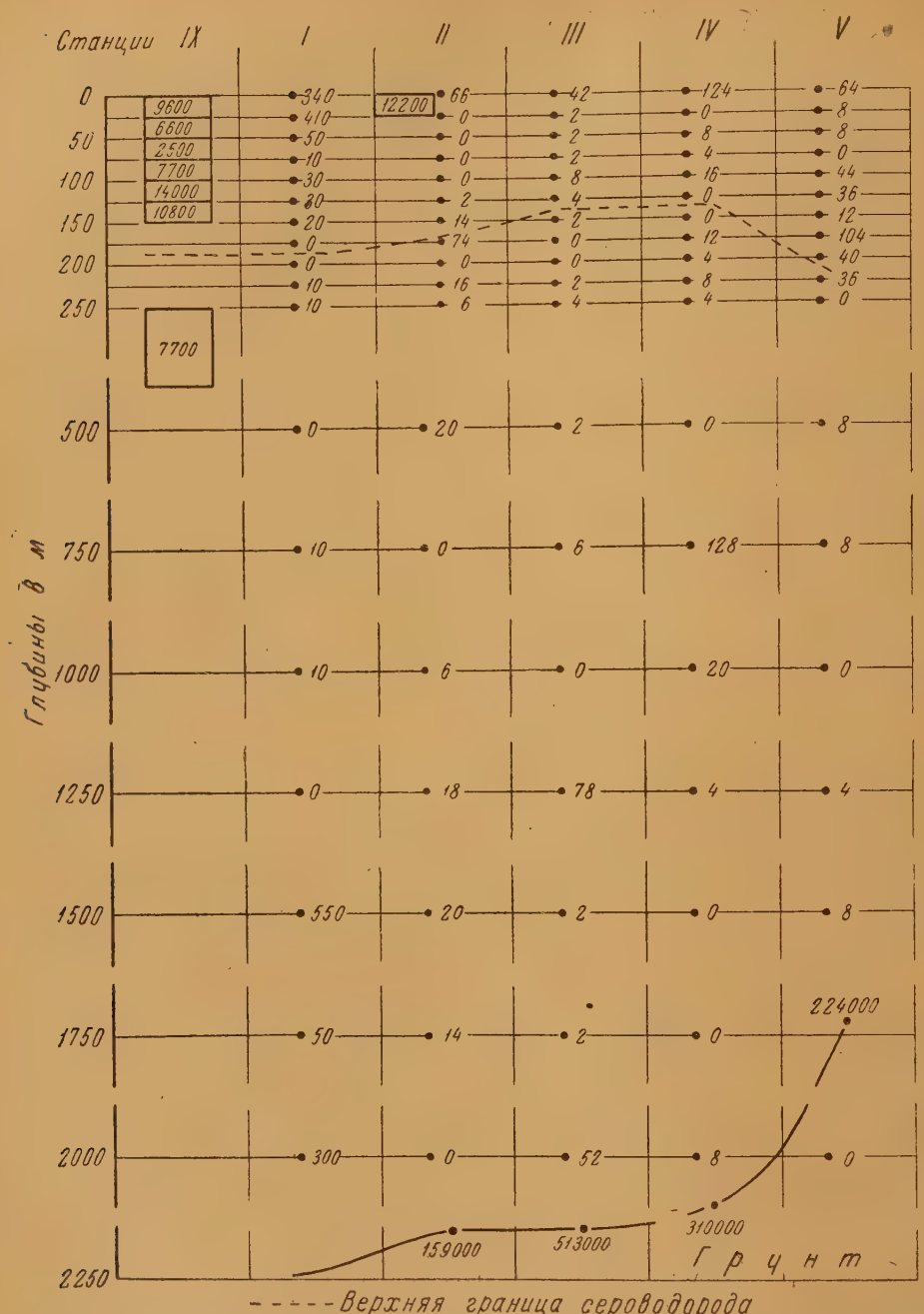


Рис. 1. Количественное распространение микроорганизмов в водной толще Черного моря. Цифры в прямоугольниках выражают число микроорганизмов в планктоносфере

полученными при исследовании проб воды из батометров. Трудно предположить, что при облавливании определенного слоя воды концентрируются не только планктонные макроорганизмы, находящиеся в этом слое, но и микроорганизмы: размеры ячеек планктонной сетки достаточно велики, пропуская вместе с водой и микробные тела.

Надо полагать, что в непосредственной близости у животных и растительных особей, вне их или внутри, если речь идет о полостных

формах, создаются благоприятные условия для размножения микроорганизмов, благодаря сравнительному богатству здесь органического вещества — продуктов обмена и распада планктонных организмов. В этой сфере микробиальной жизни — сфере планктона — наблюдается не только повышенное содержание микроорганизмов, но и большое разнообразие микробных форм. Из относительно малого числа взятых проб нами был выделен 21 вид.

Мы считаем целесообразным ввести для характеристики данного типа местообитания микроорганизмов термин «планктоносфера». В своем значении понятие «планктоносфера», определяя метабиотические отношения микроорганизмов и зоопланктона и фитопланктона, аналогично понятию «ризосфера», которое, как известно, характеризует микробное население корневой зоны растения в почве.

Значительно меньшие количества микроорганизмов выявлены в пробах воды из различных горизонтов водной толщи. В пересчете на 1 мл воды они исчислялись обычно единицами или десятками. Некоторые пробы воды оказывались стерильными и при посеве на рыбопептонный агар 0,5 мл воды. Такие стерильные пробы, т. е. пробы, не содержащие в 0,5 мл воды даже одной клетки, способной развиваться на рыбопептонном агаре, были получены на 1-й станции с горизонтов 175, 200, 500, 1 250 м; на 2-й станции с горизонтов 25, 50, 75, 100, 200, 750, 2 000 м, на 3-й станции — с горизонтов 175, 200, 1 000 м, на 4-й станции — с горизонтов 25, 125, 150, 500, 1 500, 1 750 м и на 5-й станции — с горизонтов 75, 250, 1 000 м. Различная локализация этих стерильных горизонтов на пяти станциях говорит против наличия больших безжизненных пространств в толще воды; причиной является малая плотность на глубинах микробного населения. Копп [9], засевая белковые среды большими количествами воды — больше 1 мл, не обнаружил ни одной стерильной пробы.

С другой стороны, в некоторых пробах воды, например, с глубины 1 500 и 2 000 м на 1-й станции, 1 250 м на 3-й станции, 750 м на 4-й станции и 175 м на 5-й станции неожиданно открывались сравнительно большие количества микроорганизмов, до нескольких сотен на 1 мл воды. Эти случаи, повидимому, вызваны попаданием в пробу воды остатков планктонных организмов, опускающихся на дно окруженными микроорганизмами.

Наиболее заселенным микроорганизмами оказался поверхностный слой грунта Черного моря. В глубоководной зоне на больших глубинах насчитывалось несколько сотен тысяч микробных клеток в пересчете на 1 г невысушенного ила, если судить по числу выросших колоний. Несомненно, что общее количество микроорганизмов значительно выше, если учесть рост на некоторых жидких средах в разведении ила 10^{-7}. Укажем также на данные Исаченко [8], который в одной пробе грунта с глубины 2 188 м методом прямого счета определил 274 млн. бактериальных особей на 1 г ила. Приведенные цифры по своему значению приближаются к цифрам, характерным для почв, свидетельствуя о развитии микробиальной жизни на дне моря в сероводородной области.

Распространение некоторых видов микроорганизмов в Черном море

Подробные описания видов микроорганизмов, населяющих Черное море, с указанием места их обнаружения даны в другой статье (Крисс, Рукина и Бирюзова [12]).

Здесь нам хотелось обратить внимание на распространение некоторых видов кокков, микобактерий, неспороносных палочек и спороносных бактерий в водной массе глубоководной области Черного моря (рис. 2, 3, 4). Напомним, что расстояние между первой и пятой станциями составляло по прямой 200 км. 9-я гидрологическая станция была расположена между 1-й станцией и берегом, примерно в 30 км от него.

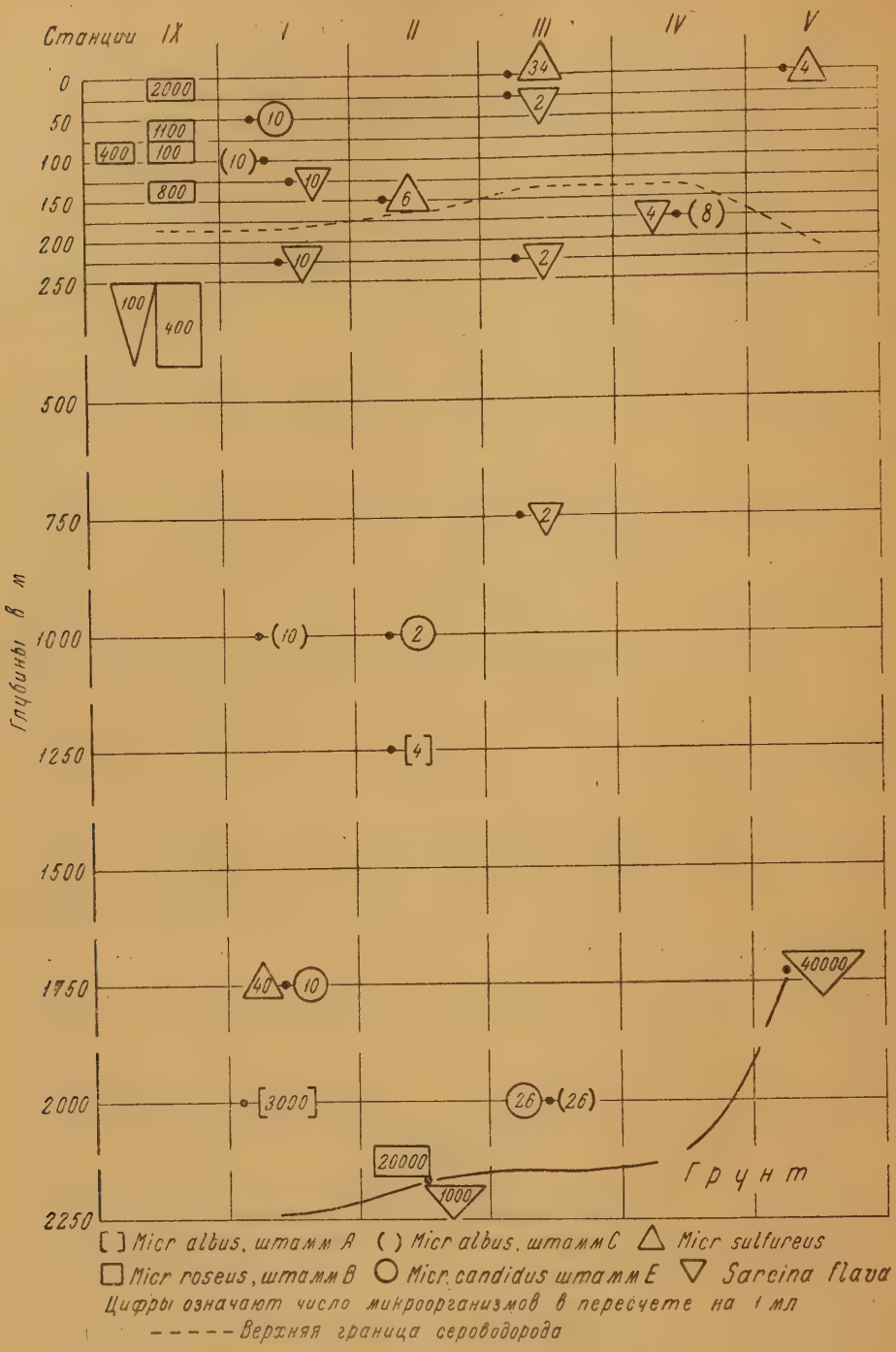


Рис. 2. Распространение некоторых видов кокков в Черном море

Естественно, что эпизодические обследования позволяют выявить лишь отдельные фрагменты общей картины видового распределения микроорганизмов в Черном море. Однако, благодаря сравнительно большому масштабу проведенных исследований, было исследовано более 100 проб воды — эти фрагменты дают возможность без труда составить эскиз всей картины.

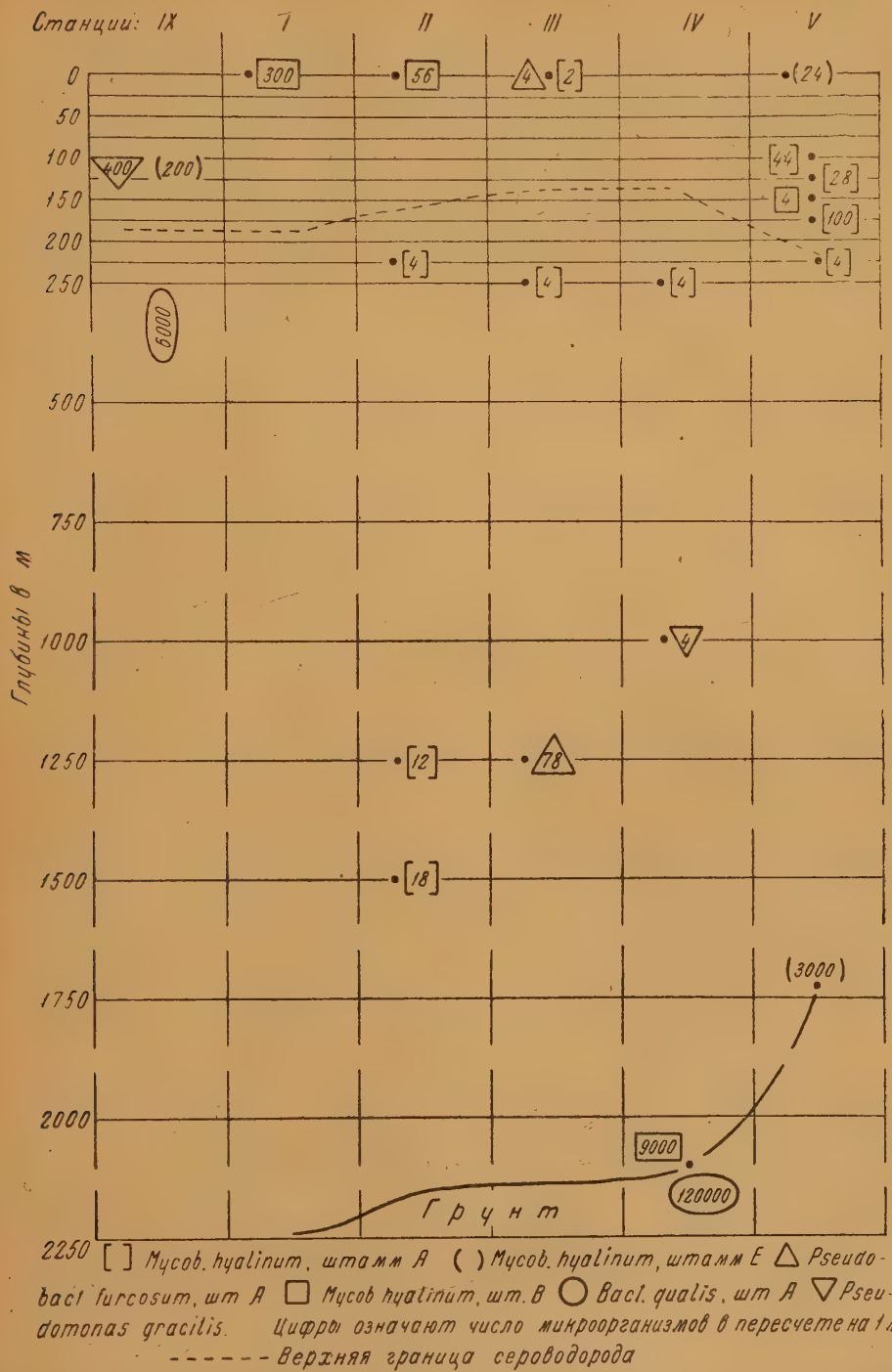


Рис. 3. Распространение некоторых видов микобактерий и неспороносных палочек в Черном море

Из рис. 2, 3, 4, видно, что Micrococcus albus, штамм С, M. sulfureus, Sarcina flava, Mycobacterium hyalinum, штамм А, Mycobacterium hyalinum, штамм В, Mycobacterium hyalinum, штамм Е, Bacillus subtilis, Bacillus angulans, штамм С, Pseudomonas gracilis оказались распро-

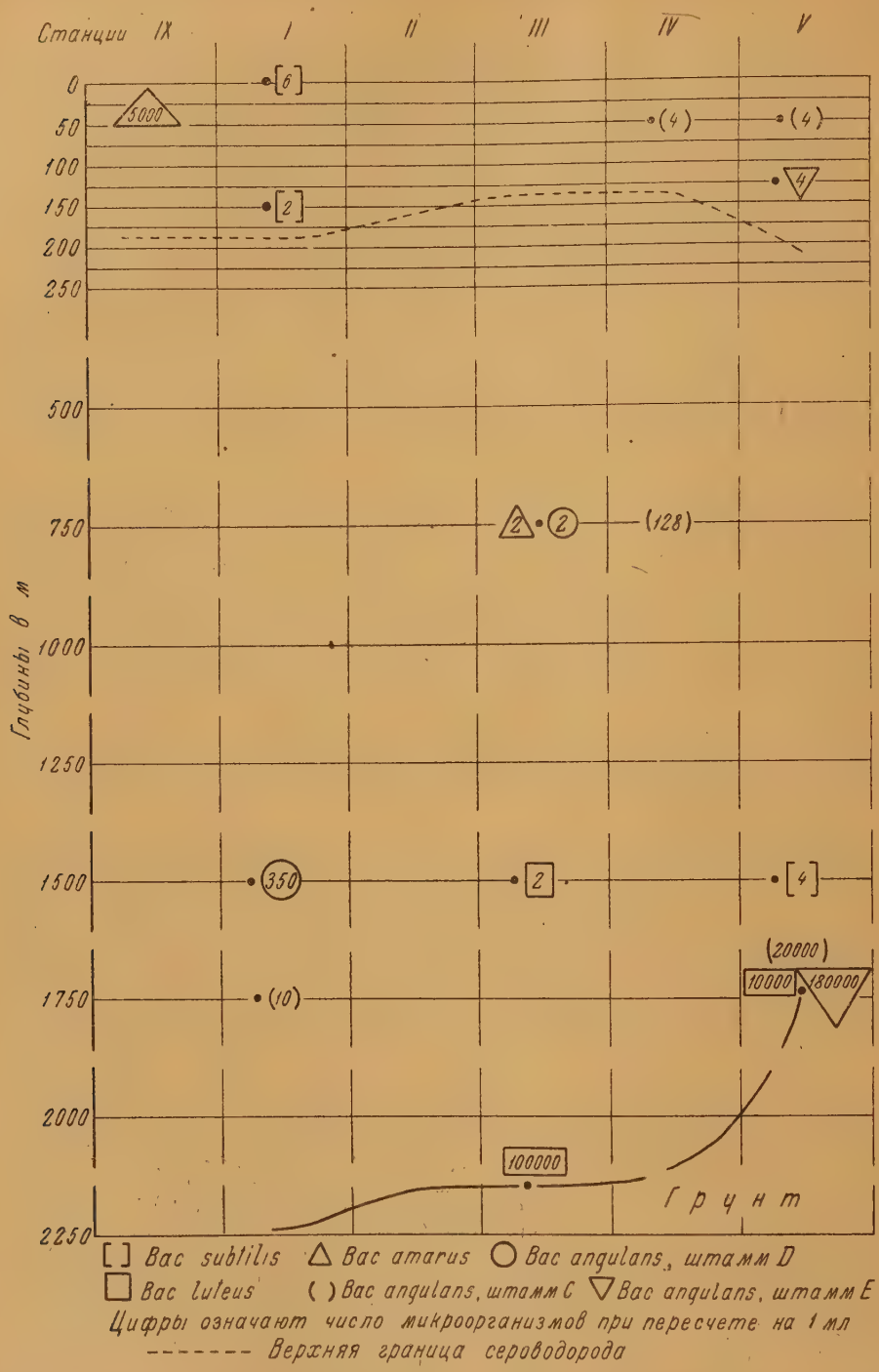


Рис. 4. Распространение некоторых видов спороносных бактерий в Черном море

страненными формами в Черном море. Они встречались на ряде станций, на большом удалении друг от друга. Если рассматривать сделанный экспедицией разрез, как диаметр круга, то необходимо признать ареалы этих видов достаточно широкими, охватывающими значительную площадь моря. Говоря об ареалах, мы имеем в виду местообита-

ния перечисленных видов в планктических областях, в кислородной зоне и в поверхностных слоях грунта Черного моря.

Одни и те же виды были встречены не только на значительном расстоянии друг от друга, но и на различных глубинах. Например, Micrococcus roseus обнаружен в планктоносфере на 9-й станции и в илу на 2-й станции. Микобактерия Mycobacterium hyalinum, штамм Е, встречена на 5-й станции у поверхности воды и на дне моря и на 9-й станции в улове планктона. Неспороносная палочка Bact. qualis, штамм А, выявлена в планктоносфере на 9-й станции и в грунте на 4-й станции. Споровая бактерия Bacillus angulans, штамм С, найдена на глубине 50 и 750 м на 4-й станции и на глубине 50 м и в илу на 5-й станции.

Эти примеры так же, как и другие, приведенные на рисунках, позволяют судить о происходящих в Черном море процессах перемещения целого ряда микробных форм из вышележащих слоев в донную часть моря. Опускание далеко не всегда связано с наличием активного движения: в число указанных видов входят виды, у которых активные движения не обнаружены. Повидимому, большинство микроорганизмов увлекается на большие глубины остатками планктонных организмов, органическими частицами и тому подобным материалом, пригодным для пищевых целей, рассеиваясь на пути следования на дно.

Переход из кислородной зоны в сероводородную и дальнейший путь в условиях отсутствия кислорода в воде для целого ряда микробных видов не являются гибельными. На рисунках помещена лишь небольшая часть выделенных из сероводородной области микробных форм, сохранивших жизнеспособность. Многие из этих форм, попадая на дно, встречают там благоприятные возможности для размножения. Например, Micrococcus roseus, штамм В, Bact. qualis, штамм А, Mycobacterium hyalinum, штамм Е, насчитывались в планктоносфере сотнями или тысячами, а в илах они определялись десятками и даже сотнями тысяч. Подобные факты свидетельствуют о том, что в грунтах Черного моря, благодаря сравнительно высокому содержанию органического вещества, резко возрастает численность многих видов микроорганизмов, попавших из поверхностных слоев моря. Численность их здесь значительно выше в сравнении с планктоносферой, сферой максимального развития микробной жизни в кислородной зоне, указывая на высокую интенсивность микробиологических процессов, происходящих на дне моря.

Количественное распределение видов микроорганизмов в кислородной и сероводородной зонах Черного моря

Процесс перемещения из кислородной зоны в сероводородную не является безразличным для всех микробных видов, обитающих в поверхностных слоях воды. Известная часть микробных форм не приспосабливается к новым условиям существования и погибает. К таким выводам нас привели результаты подсчетов видов микроорганизмов, обнаруженных в слое воды 0—250 м, слое 250—2 000 м, т. е. в слое, не содержащем и следов кислорода, и в илах сероводородной области, на глубинах 1 730—2 240 м (табл. 1).

Как видно из таблицы, видовое разнообразие микроорганизмов заметно уменьшается при переходе в слои воды, зараженные сероводородом. Если в кислородной зоне число видов составляло 52, то в водной массе сероводородной области было выявлено 28, а в грунте — 18. Показательно также, что на одной и той же станции уловы планктона из слоев воды от 10 до 150 м содержали 17 видов микроорганизмов, тогда как улов в сероводородной зоне из слоя 250—400 м принес только 5 микробных видов.

Уменьшение числа видов на больших глубинах наблюдается у всех исследованных систематических групп микроорганизмов — кокков, мико-

Таблица 1

Количественное распределение видов микроорганизмов в различных зонах Черного моря

Зоны моря		Кокки	Микобактерии	Неспороносные палочки	Спорные бактерии	Всего
Кислородная зона 0—250 м	Вода	13	5	5	12	52
	Планктоносфера	5	4	6	2	
Сероводородная зона 250—2 000 м	Вода	10	1	7	5	28
	Планктоносфера	2		3		
Грунт		4	2	5	7	18

бактерий, неспороносных палочек и споровых бактерий, но не в равной степени. Мы не склонны говорить о большей или меньшей выносливости той или иной систематической группы микробов к повышенному содержанию сероводорода или отсутствию свободного кислорода, полагая, что в данных случаях речь может итти лишь о видовой приспособляемости, а не о групповой: цифры в соответствующих рубриках лишь позволяют судить о закономерном процессе гибели некоторых микробных форм независимо от их групповой принадлежности при опускании на большие глубины Черного моря.

Наименьшее число видов было обнаружено в поверхностном слое грунта. Выступает заметная разница в видовом многообразии между водной массой сероводородной области и дном. Возможно, что это явление вызвано утратой жизнеспособности опускающихся сквозь толщу воды сероводородной области микроорганизмов только после известных сроков пребывания в сероводородной зоне. Возможно также, что не все формы приспосабливаются к новым условиям обитания в илах в обстановке борьбы за существование с заселяющими грунт моря массовыми видами микроорганизмов. Однако все же следует признать в абсолютном выражении число видов, встреченных на дне моря, высоким, учитывая глубину в обследованном районе моря и большую численность этих микробных форм.

Способность микробных форм, выделенных из Черного моря, к развитию в условиях анаэробиоза

Итак, по мере опускания микроорганизмов из кислородной зоны часть видов, проходя сероводородную зону, сохраняет свою жизнеспособность, возможно размножается в пути на органических частицах и, достигая дна, находит там благоприятные условия для жизнедеятельности. Другая часть видов, попадая в новую экологическую обстановку и не будучи приспособлена к ней, рано или поздно погибает.

Несомненно, много причин способствует гибели ряда микробных форм на больших глубинах в сероводородной области. Здесь может играть роль недостаток пищевого материала — сравнительная бедность органическим веществом по сравнению с кислородной зоной, ядовитое действие сероводорода, отсутствие свободного кислорода и т. д. Но нам казалось вполне очевидным предположение, что определяющим фактором в сохранении данной микробной формы при передвижении в водной толще, зараженной сероводородом, явится ее способность к перестройке своего типа дыхания с аэробного на анаэробный. В самом деле,

главной особенностью сероводородной зоны, с точки зрения потребностей живого, является отсутствие свободного кислорода, и поэтому можно думать о неминуемой гибели тех микробных видов, которые не в состоянии осуществить переход на анаэробный тип дыхания или обладают способностью лишь избирательно использовать источники связанного кислорода.

Именно эти соображения и побудили нас провести предварительные опыты по выяснению способности всех выделенных видов к размножению на органической среде в отсутствие свободного кислорода. Выше уже указывалось, что сравнивалось развитие на бульоне одних и тех же микробных форм в условиях вакуума и с доступом воздуха.

Эти исследования показали, что среди выделенных форм встречаются три группы: не растущие на бульоне в условиях вакуума, развивающиеся очень слабо в виде едва уловимого осадка на дне пробирки и размножающиеся в отсутствие свободного кислорода так же хорошо, как и на воздухе. Мы объединили первые две группы в группу аэробных видов, а третью группу — в группу факультативно-анаэробных видов.

В табл. 2 представлено количественное распределение аэробных и факультативно-анаэробных видов в кислородной и сероводородной зонах Черного моря по данным проведенных опытов.

В кислородной зоне из 52 встреченных там видов 40 оказались аэробными, а 12 факультативно-анаэробными видами. В сероводородной области число видов резко сократилось, почти вдвое; видовое разнообразие уменьшилось почти целиком за счет аэробных видов. Не в столь выраженной степени, но вполне очевидно, что на дне моря уменьшение количества видов происходит большей частью по линии аэробных видов.

Таблица 2

Число аэробных и факультативно-анаэробных видов в кислородной и сероводородной зонах Черного моря

Зона моря	Общее число видов	Число аэробных видов	Число факультативно-анаэробных видов
Кислородная зона, слой воды 0—250 м	52	40	12
Планктоносфера	17	12	5
Сероводородная зона, слой воды 250—2 000 м . .	28	17	11
Планктоносфера	5	1	4
Грунт	18	11	7

Если сопоставить, далее, числа, полученные для планктоносферы кислородной зоны, и числа, относящиеся к планктоносфере сероводородной области, то станут ясными причины столь заметного снижения числа видов в сфере планктона из слоя 250—400 м. Здесь обнаружен только один аэробный вид, между тем число факультативно-анаэробных видов почти не сократилось.

Эти опыты приводят к заключению, что гибель ряда микробных форм в сероводородной области обусловлена главным образом изменением условий для их дыхательной деятельности. Являясь облигатными аэробами или, вероятнее, формами, способными использовать лишь ограниченный круг веществ в качестве донаторов кислорода, они оказываются неприспособленными к существованию в сероводородной зоне.

С другой стороны, эти опыты позволяют думать, что сохраняющиеся на больших глубинах аэробные виды, добавим, что некоторые из них в илу достигают большой численности, возможно проявили себя строгими аэробами в наших опытах, благодаря отсутствию способности к использованию кислородосодержащих веществ бульона. Другие, более мобильные соединения, как, например, нитраты, могли бы вызвать иной эффект: обеспечить им развитие. Но, может быть, в силу еще не изученных нами явлений на дне моря в сероводородной области создаются условия для образования микрозон со свободным кислородом, вероятно, готчас же in statu nascendi вступающим в реакции окисления, но все же какие-то моменты существующим.

Выводы

Микробиологические исследования в глубоководной части Черного моря на станциях, далеко расположенных от берегов, позволили выявить ряд особенностей в распределении микробного населения в водной толще.

Наиболее заселенной микроорганизмами оказалась кислородная зона, особенно сфера планктона. В планктоносфере количество микробов равнялось тысячам. Многие виды оказались распространенными формами, они встречались на значительном удалении друг от друга, их ареалы покрывали значительную площадь моря.

В Черном море происходит непрерывный процесс перемещения микроорганизмов из кислородной зоны на большие глубины в донную часть моря. Увлекаемые остатками планктонных организмов или другими частицами, опускающимися на дно, микроорганизмы пересекают огромную толщу воды сероводородной зоны. Плотность микробного населения в сероводородной области не велика. Часть микробных видов, не приспособленная к новым условиям их дыхательной деятельности в сероводородной зоне, гибнет, другие микробные формы — факультативные анаэробы — сохраняют жизнеспособность и в случае, если они связаны с неразложившимися полностью частицами органического вещества, размножаются по пути следования на дно, рассеиваясь в толще воды, или достигают дна. Ряд видов микроорганизмов, достигнув дна, находит там возможности для массового размножения. Численность некоторых микробных форм в поверхностных слоях илов Черного моря на глубинах, превышающих 2 000 м, исчисляется десятками и сотнями тысяч, свидетельствуя о высоком уровне микробиологических процессов разложения органического вещества на дне моря.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР, Москва
и
Севастопольская биологическая
станция Академии Наук СССР

Получено 29.XII.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Водяницкий В. К вопросу о биологической продуктивности Черного моря. Тр. Зоол. ин-та, VII, 7, 1941.
2. Водяницкий В. Основной водообмен и история формирования солености Черного моря. Тр. Севаст. биол. станции, 6, 386, 1948.
3. Гурфейн Л. Применение батометров для выемки проб воды при микробиологических исследованиях. Дальн. медиц. журнал, 1, 1935.
4. Зелинский Н. О сероводородном брожении в Черном море и Одесских лиманах. Журн. Русск. физико-хим. об-ва, 25, 299, 1893.
5. Зелинский Н. и Брусиловский Е. О сероводородном брожении в Черном море и Одесских лиманах. Южно-русск. мед. газета, № 18—19, 1893. и Отчеты о деятельности Одесск. бальнеолог. об-ва. 1892—1893, вып. 5. Одесса, 1898.

6. Исаченко Б. О бактериальных процессах в Азовском и Черном морях. Тр. 1 Всер. съезда гидрологов, 1925.
7. Исаченко Б. Микробиологические исследования морей СССР (1917—1937). Микробиология, 6, 964, 1937.
8. Исаченко Б. Микроскопический анализ грунтов Азовского и Черного морей. Зап. Гос. гидрол. ин-та, X, 1933.
9. Копп Ф. К микробиологии Черного моря. Тр. Севаст. биол. станции, 6, 298, 1948.
10. Крисс А. Микроорганизмы восточной части Северного Ледовитого океана. Микробиология, XIV, 268, 1945.
11. Крисс А. и Рукина Е. Бактериофаг в море. ДАН СССР, т. LVII, 833, 1947.
12. Крисс А., Рукина Е. и Бирюзова В. Микробиология Черного моря. 2. Видовой состав микроорганизмов Черного моря. Тр. Севаст. биол. станции, 7. 1949.

О ПРАВИЗНЕ — ЛЕВИЗНЕ У BACILLUS MYCOIDES

1. ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ РАСПРОСТРАНЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРАВОЗАВИТЫХ И ЛЕВОЗАВИТЫХ ФОРМ

Г. Ф. Гаузе

1. Введение

Проблема асимметрии протоплазмы была впервые выдвинута Пастером в области микробиологии. В 1860 г. в работе «О зеленой плесени и молекулярной дисимметрии естественных органических веществ» Пастер впервые показал физиологическую неравноценность оптических изомеров винной кислоты. Лишь правовращающая форма кислоты усваивается зеленой плесенью. Пастер писал, что этот факт «имеет важнейшее значение с точки зрения законов тонкой организации живых существ».

С тех пор прошло около 90 лет, и новейшие успехи микробиологии приносят все новые доказательства важной роли асимметрии протоплазмы в жизни микробной клетки. Здесь достаточно указать на механизм действия антибиотиков. В состав пенициллина, тиротрицина, грамицидина С и стрептомицина входят оптически извращенные молекулы некоторых аминокислот и углеводов, чуждые «левовращающим» компонентам протоплазмы. Повидимому, оптическое извращение молекул обусловливает подавление антибиотиками ферментативных процессов у чувствительных микробов, и тем самым оптическая инверсия играет важную роль в механизме антибиотического действия (Гаузе [2]).

В связи с этими наблюдениями проблема асимметрии протоплазмы в области микробиологии нуждается в серьезной теоретической разработке. Особое внимание привлекают правозавитые и левозавитые формы обычного почвенного микроба Bac. mycoides. В каком отношении находятся морфологические свойства этих бактерий (легко видимый невооруженным глазом на чашке Петри правозавитой или же левозавитой характер роста) к молекулярным свойствам химических веществ, образующих протоплазму бактерий? Разрешение этого вопроса не менее существенно для дальнейшего развития физиологии, чем установление связи между формой кристаллов винной кислоты и вращением ими плоскости поляризации света, обнаруженное Пастером и послужившее исходным пунктом для развития современной стереохимии. На примере бактерий выяснение связи морфологической инверсии с молекулярной инверсией может явиться исходным пунктом для развития совершенно новых представлений о пространственном строении протоплазмы.

2. Географическое распространение правозавитых и левозавитых форм Bac. mycoides

Хорошо известно, что в почвах средней полосы Союза повсеместно распространены левозавитые формы Bac. mycoides, а правозавитые варианты встречаются лишь в виде крайне редкого исключения. Как отмечает Мишустин [3], правозавитые формы можно изредка обнаружить лишь в горных местностях (Кавказ, Урал). Настюкова [4] установила, что в то время как в почвах средней России правозавитых

форм Вас. mycoides практически невозможно обнаружить и повсеместно распространены лишь левые формы, в почвах Закавказья правозавитые формы этого микроба встречаются более часто.

С целью дальнейшего изучения этого вопроса нами был произведен учет встречаемости правозавитых и левозавитых форм Вас. mycoides в различных почвах. При этом была использована картофельная среда, на которой направление завитков растущих бактерий проявляется весьма резко (картофельный отвар — 10%; пептон — 0,1%; глюкоза — 0,5%; $MgSO_4$ — 0,04%; K_2HPO_4 — 0,04%; агар-агар — 3%). На поверхность картофельного агара в чашке Петри помещался небольшой кусочек почвы, и через 48 часов инкубации при 28° учитывалось направление завитков у колоний Вас. mycoides, выросших из данного образца почвы. Каждый образец почвы изучался в 10 параллельных опытах. Колонии бактерий с неопределенным направлением завитков исключались из учета и подсчитывались лишь завитые формы (налево или направо). Результаты этих опытов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Распространение левозавитых и правозавитых форм Вас. mycoides в различных почвах

Происхождение почвы	Процент форм	
	левых	правых
Москва, Тимирязевская академия	100	0
Берлин, Ботанический сад	100	0
» » »	100	0
Росток (Германия)	100	0
Саратов	100	0
»	100	0
Сталинград	100	0
Солнцево, Курской обл.	100	0
» » »	100	0
Лозовая, Харьковской обл.	100	0
» » »	100	0
Мисхор, Крым	100	0
» »	100	0
Белореченская, Сев. Кавказ	100	0
Гагры	83	17
»	100	0
»	100	0
»	78	22
»	45	55
Сухуми	12	88
Тбилиси	80	20
Батуми	60	40

Данные, приведенные в табл. 1, подтверждают наблюдения Настюковой и показывают, что в почвах Закавказья широко распространены правозавитые формы Вас. mycoides, которые совершенно отсутствуют в равнинных почвах СССР и Средней Европы.

В дальнейшем нами было изучено распространение левозавитых и правозавитых форм Вас. mycoides в почвах Бразилии, собранных Балуевым летом 1947 г. Полученные при этом результаты приведены в табл. 2. Как показывает таблица, в окрестностях прибрежных городов Рио-де-Жанейро и Сантос преимущественно распространены левозавитые формы Вас. mycoides и лишь в отдельных пробах почвы наблюдается небольшой процент правозавитых форм; распределение правых и левых форм этого почвенного микроба здесь крайне близко к тому, что можно наблюдать, например, в районе Гагр. Совершенно иная и крайне своеобразная картина наблюдается в некоторых континенталь-

ных районах Южной Америки. В почвах, взятых в окрестностях городов Сан-Паоло и Ароша, было обнаружено 100% правозавитых форм, совершенно отсутствующих в почвах Средней России и не встречающихся в таком большом количестве в почвах Закавказья. Таким образом, почвы Средней России заселены исключительно левозавитой формой, а некоторые почвы континентальных районов Южной Америки — исключительно правозавитой формой Bac. mycoides.

Таблица 2

Распространение левозавитых и правозавитых форм Bac. mycoides в почвах Бразилии

Происхождение почвы	Процент форм	
	левых	правых
Рио-де-Жанейро	100	0
»	100	0
»	100	0
»	100	0
»	88	12
Сантос	100	0
Сантос, пляж морских черепах	77	23
Ангра-дос-Рейс	45	55
Терезополис, вблизи Рио-де-Жанейро	100	0
Сан-Паоло, огород	0	100
Территория Бутантан	65	35
Сан-Паоло, огород (другая проба)	0	100
Штат Минос-Жерайс, в 30 км от г. Ароша	0	100
г. Ароша, городской сад	34	66
Штат Минос-Жерайс, площадка астрономической экспедиции	100	0

3. Скорость роста левозавитых и правозавитых форм Bac. mycoides

Скорость роста является важным физиологическим признаком, тесно связанным с организацией микробной клетки. Нами был изучен рост левозавитых и правозавитых штаммов Bac. mycoides; каждая пара штаммов выделялась из одной и той же почвы. В этой работе были использованы как кавказские, так и бразильские культуры. Споры бактерий из пробирочной культуры наносились в виде точки на картофельный агар в чашке Петри, и через 24 часа инкубации при 28° измерялся диаметр (в миллиметрах) выросшей колонии бактерий. Результаты этих измерений приведены в табл. 3. Каждая культура измерялась трижды, в трех параллельных опытах.

На основании данных, приведенных в табл. 3, мы можем заключить, что правозавитые культуры Bac. mycoides обладают более медленным темпом роста по сравнению с левыми. Как среди кавказских, так и среди бразильских культур величина правозавитых колоний в два раза отстает от величины левозавитых колоний через 24 часа после начала роста. На основании изучения 43 культур мы можем заключить, что эти различия не случайны, а связаны с правозавитым или же левозавитым характером роста. Замедленный темп роста правых культур отражает их физиологическую слабость по сравнению с левыми.

4. Влияние оптических изомеров акрихина на рост правозавитых и левозавитых штаммов Bac. mycoides

Алпатов и Настюкова в своей работе сравнили действие оптических изомеров акрихина на две правозавитые и две левозавитые культуры

Таблица 3

Скорость роста левозавитых и правозавитых форм Bac. mycoides на агаре. Диаметр колонии в миллиметрах через 24 часа роста на картофельном агаре при 28°. Каждая цифра представляет собой среднюю величину из трех измерений

Культуры	Номер культуры	Культуры	
		левые	правые
Кавказские	1	34	15
	2	33	19
	3	27	15
	4	23	17
	5	19	14
	6	19	15
	7	34	13
	8	37	16
	9	24	9
	10	41	16
	11	37	12
	12	31	12
	13	26	13
	14	36	15
	15	22	12
	16	—	16
	17	—	9
	18	—	13
	Среднее	29,5	13,9
Бразильские	1	23	11
	2	28	10
	3	19	9
	4	23	15
	5	21	11
	Среднее	22,8	11,2

Bac. mycoides [1]. Алпатов и Настюкова сообщают, что левозавитые культуры бактерий сильнее подавляются левовращающим акрихином, а правозавитые культуры — правовращающим акрихином. В последующей работе Настюкова и Алпатов [4] пишут: «Если допустить, что отличия в реакции на левый и правый акрихин связаны с инверсией рецептора акрихина на молекулярном уровне, то эти опыты являются первым по времени доказательством связи морфологической инверсии бактериальной колонии с оптической инверсией молекул какого-то компонента протоплазмы — вероятнее всего, какого-нибудь фермента».

В связи с весьма ответственным характером этого заключения экспериментальные данные Алпатова и Настюковой нуждаются в экспериментальной проверке. Имеющееся в нашем распоряжении большое число свежевыделенных правозавитых и левозавитых культур Bac. mycoides (как кавказских, так и бразильских) позволило нам предпринять такую проверочную работу.

В ряде разведочных опытов с кавказскими культурами мы не смогли подтвердить данных Алпатова и Настюковой. В связи с этим нами была поставлена обширная серия опытов, результаты которых приведены в табл. 4. В этих опытах 1% раствор акрихина, приготовленный на стерильной дестиллированной воде с соблюдением условий асептики, прибавлялся к расплавленному картофельному агару с таким расчетом, чтобы концентрация акрихина в агаре составляла 0,0035%. Акрихино-

вый агар тщательно перемешивался и разливался по чашкам Петри. На поверхность застывшего агара в виде точки наносились споры бактерий из пробирочной культуры, и через 24 часа роста при 28° измерялись диаметры колонии бактерий.

Каждая культура бактерий параллельно измерялась на трех средах: 1) картофельный агар без акрихина; 2) картофельный агар с правовращающим акрихином; 3) картофельный агар с левовращающим акрихином. На каждой из этих сред ставилось по три параллельных опыта. На основании средних величин, полученных при промерах, высчитывался процент угнетения роста бактерий левым или же правым акрихином по сравнению с ростом контроля без акрихина. Такие расчеты делались как для правозавитых, так и для левозавитых культур Bac. mycoides (табл. 4).

Таблица 4

Угнетение роста правозавитых и левозавитых культур Bac. mycoides оптическими изомерами акрихина

Bac. mycoides	Подавление роста акрихином в процентах по отношению к росту контроля без акрихина	
	левовращающий акрихин	правовращающий акрихин
Левые культуры		
Кавказский L 2	7,2	7,2
» L 12	11,1	16,6
Бразильский L 1	30,4	21,7
» L 5	16,0	28,0
Правые культуры		
Кавказский D 1	20,0	6,6
» D 3	27,7	27,7
» D 6	5,5	16,6
» D 7	11,1	11,1
Бразильский D 1	17,7	17,7
» D 2	16,6	16,6
Среднее для левых культур	16,2	18,4
Среднее для правых культур	16,4	16,0

Полученные нами данные на 10 культурах (4 левых и 6 правых) показывают, что как правозавитые, так и левозавитые культуры Bac. mycoides в одинаковой степени подавляются обоими оптическими изомерами акрихина. Тем самым отпадает заключение Алпатова и Настюковой о том, что морфологическая инверсия у Bac. mycoides связана с инверсной чувствительностью этих бактерий к оптическим изомерам акрихина. Проверочное исследование не позволяет обнаружить специфических различий в реакции правозавитых и левозавитых культур Bac. mycoides на оптические изомеры акрихина.

Выводы

1. Изучение географического распространения правозавитых и левозавитых форм Bac. mycoides подтверждает наблюдения Мишустина и

Настюковой и показывает, что в то время как в почвах Средней России правозавитые формы Вас. mycoides практически невозможно обнаружить и повсеместно распространены лишь левозавитые формы, в почвах Закавказья правозавитые формы этого микроба встречаются более часто.

2. В почвах Южной Америки (Бразилия) нами впервые обнаружены районы, целиком заселенные правозавитой формой Вас. mycoides, крайне редкой в Европе.

3. Изучение темпа роста правозавитых и левозавитых культур (выделенных из одних и тех же почв) показало, что правые культуры обладают более медленным темпом роста по сравнению с левыми культурами. Это заключение основано на изучении 43 культур и справедливо как для кавказских, так и для бразильских культур. Замедленный темп роста правых культур отражает их физиологическую слабость по сравнению с левыми формами.

4. Проверка сообщения Алпатова и Настюковой о специфических различиях в чувствительности правых и левых форм Вас. mycoides к оптическим изомерам акрихина не подтвердила их заключений. Как правозавитые, так и левозавитые культуры Вас. mycoides в одинаковой степени подавляются обоими оптическими изомерами акрихина.

Институт малярии и медицинской паразитологии Академии медицинских наук СССР

Получено 24.III.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Алпатов В. В. и Настюкова О. К. О специфичности действия оптических изомеров акрихина на левую и правую формы Вас. mycoides. ДАН СССР, LIV, стр. 541, 1946.
2. Гаузе Г. Ф. Антибиотики и оптическая активность. Успехи совр. биол., 23, 405, 1947.
3. Мишустин Е. Н. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий. Изд. АН СССР, 1947.
4. Настюкова О. К. и Алпатов В. В. Об экологии и физиологии лево- и правозавитых форм Вас. mycoides. Микробиология, XVII, 42, 1948.
5. Настюкова О. К. О географическом распространении левых и правых форм Вас. mycoides. ДАН СССР, LIX, № 9, 1948.

О НОВОМ ПИГМЕНТНОМ КОККЕ

М. М. Макарова

При изучении эпифитной микрофлоры различных растений всегда приходится наблюдать известное постоянство выявляемых в ней группировок микроорганизмов. Наиболее богато количественно и разнообразно в видовом отношении на зеленой растительной массе представлена группа гнилостных микроорганизмов. Эта группа, выявляемая нами на МПА и агаре из сока исследуемой растительной массы, всегда имеет в своем составе значительное количество пигментных видов, среди которых доминируют желтопигментные бактерии и кокки. Наряду с желтыми колониями в посевах на указанных средах выявляются, но в значительно меньшем количестве, другие пигментные виды.

Летом 1936 г. при изучении микрофлоры свежескошенного клевера в связи с постановкой опытов по силосованию мною на этих средах наряду с обычно встречающимися видами были обнаружены резко отличные по окраске колонии зеленого цвета. Микроскопирование препаратов (неокрашенных) из этих колоний показало, что здесь мы имеем дело с чрезвычайно интересным микроорганизмом шаровидной формы, накапливающим в культуре, в частности на МПА, пигментное вещество в виде окрашенных в синий цвет бесформенных глыбок, или комочков.

Выделенный нами из этих колоний кокк поддерживается на МПА в течение ряда лет. До сего времени он прекрасно сохраняет свои морфологические и культуральные особенности, а также способность к пигментообразованию. Эта способность не теряется даже и после длительных сроков хранения культуры в той или иной среде, благоприятной для накопления пигмента.

Наблюдения за развитием этого кокка в молодой культуре через 3, 6 и 18 часов показали, что он размножается делением, образуя соединения по два, четыре(в виде табличек) и больше клеток (в виде скоплений). С момента его выделения и до сих пор при пересевах на мясопептонный агар вначале он дает желтоватооливковый рост по штриху, постепенно приобретающий темнозеленую окраску. В связи с этим у нас возникло предположение, что мы имеем дело с двумя культурами — желтопигментной и синепигментной, совершенно идентичными по форме и размерам. Однако попытки получить раздельно ту или иную форму успеха не имели. Как правило, желтую форму мы получали в определенных условиях культивирования, в частности, на среде Эшби и синтетической среде с добавлением глюкозы и минерального азота в виде азотнокислого калия или фосфорнокислого аммония. При этом рост на этих средах всегда был слабым. При пересеве полученной на этих средах культуры на среды, благоприятные для накопления синего пигмента: мясопептонный, сусловый, картофельный агар, картина резко меняется в сторону получения нормального микробного роста по штриху и накопления синего пигмента в культуре.

Ввиду всего вышеизложенного этот микроорганизм привлек наше внимание, и в первую очередь была предпринята работа по изучению его морфологических и культуральных признаков с целью определения его систематического положения в классификации микроорганизмов. Приводимые ниже результаты этой работы с несомненностью говорят

о том, что описываемый микроорганизм представляет известные трудности в определении его места в системе микроорганизмов.

1. Шаровидные, неподвижные клетки, расположенные одиночно, попарно, по четыре в виде табличек и в большем количестве в виде комочков (цепочки не наблюдались). Наряду с правильной формой — шаровидными клетками — встречаются клетки слегка угловатые, как бы сдавленные с одной стороны. Размеры клеток сильно вариируют: в одной и той же культуре можно видеть мелкие круглые клетки размером 0,35—0,50 μ в диаметре и клетки, сильно увеличенные, от 1 до 1,7 μ величины.

Накапливающийся в культуре пигмент располагается вне клеток в виде глыбок неправильной формы, окрашенных в синий цвет и превосходящих (в старой культуре) во много раз размеры самого кокка.

Клетки по Граму окрашиваются.

2. Аэроб дает очень хороший рост по штриху на ряде питательных сред, употребляемых в микробиологической практике: мясопептонном, сусловом, картофельном, морковном и мучном агаре. Оптимальная температура роста 30°.

3. На мясопептонном агаре дает рост в виде круглых слегка возвышенных колоний, в первые дни желтовато-оливковых, постепенно приобретающих зеленую окраску. Пигмент на мясопептонном агаре не растворяется, и среда не окрашивается. Размеры колоний в редком посеве 1—2 мм в диаметре.

4. На мясопептонном агаре с сахарозой, глюкозой, лактозой, арабинозой, глицерином, маннитом колонии приобретают сине-зеленый цвет с металлическим оттенком и имеют сравнительно плоскую поверхность. Пигмент на этих средах переходит в растворимую форму и окрашивает прилежащие к колониям участки агара в фиолетовый или сине-фиолетовые цвета.

5. На мясопептонной желатине при посевах в чашки Петри дает рост в виде мелких круглых зеленых колоний с светлозелеными краями и быстрое разжижение желатины на 2—3-ьи сутки. В пробирочных посевах уколом — рост в виде гвоздя и быстрое разжижение желатины в виде воронки, переходящее в послойное.

6. В мясопептонном бульоне зеленовато-синее кольцо и небольшой осадок желтого цвета с выделением аммиака. Индол и сероводород — не обнаруживаются.

7. В молоке — сине-зеленое кольцо и осадок; в первые две недели культивирования нет видимых изменений, а затем начинается пептонизация, подщелачивание и слабое посинение всей среды.

8. На кровяном агаре гемолиза нет. Рост голубовато-зеленого цвета, прилежащие к нему участки среды окрашены в темнофиолетовый цвет.

9. На картофеле сине-зеленый штрих и голубовато-синяя окраска прилежащих к микробному налету участков среды.

10. Нитраты не восстанавливает.

11. На синтетической среде с глюкозой при добавлении минерального азота в виде фосфорнокислого аммония или азотнокислого калия — очень слабый светложелтый микробный рост.

12. На мясопептонном бульоне с добавлением глюкозы, мальтозы, лактозы, сахарозы ни кислоты, ни газа не образует.

13. На мучных агаровых средах (солодовой и пшеничной) — хороший обильный, окрашенный в синий с зеленым оттенком рост с окраской среды в интенсивно синий цвет.

Согласно полученным данным, изучаемый вид может быть отнесен к роду Micrococcus семейства Coccaceae [1]. Однако идентифицировать его с каким-либо из приведенных в определителях видов по причине некоторой специфичности поведения его на питательных средах, разнообразия клеток и по характеру пигментообразования не представляется

возможным [1, 2]. Несомненно, что здесь мы имеем дело с новым видом кокка, еще не описанным в литературе и чрезвычайно интересным с точки зрения его пигментообразующей способности, которая, как показало предварительное изучение, сильно варьирует в зависимости от состава среды. Так, при росте на мясопептонном агаре пигмент накапливается только в культуре и окрашивает ее в зеленый цвет, не проникая в среду, при добавлении же к этой среде сахарозы, глюкозы, арабинозы, мальтозы, крахмала, глицерина и маннита рост культуры приобретает сине-зеленый, с металлическим блеском, цвет, а самый пигмент при этом проникает в агар и окрашивает его в разнообразные оттенки от синего до фиолетового цвета. При культивировании на синтетической среде с глюкозой на фоне минерального азота в виде фосфорнокислого аммония или азотнокислого калия микробный налет приобретает желтый цвет.

Учитывая все изложенное, я считаю более правильным изучаемый кокк отнести к роду Micrococcus и дать название Micrococcus polychromus n. sp.

Наши предварительные опыты по извлечению пигмента из культуры описанного кокка, выращенного на мясопептонном агаре, показали, что в ряде растворителей: в воде, ацетоне, этиловом спирте, хлороформе, бензине, 0,1 N H_2SO_4, в концентрированной молочной кислоте — он не растворим. Эти показатели отличают синий пигмент описанного кокка от бактериофлуресцина и пиоцианина.

Выводы

Выделенный нами при изучении эпифитной микрофлоры клевера пигментный кокк является новым видом микрококка, чрезвычайно интересным с точки зрения механизма его пигментообразования в зависимости от состава питательной среды. Особый интерес представляет дальнейшее изучение его как индикатора на содержание в среде различных источников углерода и органического азота. Разнообразие формы клеток и разнообразная окраска самой микробной массы в культуре кокка в зависимости от состава и окраски питательной среды позволяют дать ему название Micrococcus polychromus n. sp.

Всесоюзный институт
сельскохозяйственной микробиологии
Ленинград

Получено 2.IV.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Берджс. Определитель микробов. Издание АН УССР, 1936.
2. Красильников Н. А. Определитель лучистых грибков. Из-во АН СССР, Москва, 1941.

ДРОЖЖИ НЕКОТОРЫХ ПЛОДОВ И ЯГОД И ИХ КРУГОВОРОТ В ПРИРОДЕ

А. Ф. Флеров и *Н. Н. Коваленко*

Винные дрожжи и их круговорот в природе изучались рядом авторов [1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9], причем необходимость изучения диктовалась практическими потребностями виноделия.

Дрожжи изучались обычно с технологической точки зрения, а ботаническому описанию их уделялось мало внимания. Последний пробел с успехом восполняется работами Кудрявцева [4].

Обычно изучались дрожжи осадков лучших вин и виноградных и плодово-ягодных бродящих сусел. Такие исследования не могли дать полной характеристики дрожжевой микрофлоры плодов и ягод.

По вопросу о круговороте дрожжей в природе мнения исследователей расходятся. Одни авторы основным местом обитания дрожжей считают почву, другие — винные подвалы.

В 1945—1947 гг. нами изучались винные дрожжи почвы, плодов и ягод винограда, черной и красной смородины, вишни, абрикоса, малины, ежевики, черемухи, крыжовника, алычи и их круговорот в природе по следующей методике.

В стерильное виноградное сусло нами вносились пробы стебля, листьев, цветов и плодов различных растений, а также почвы. Тотчас же из этого сусла после взбалтывания делался посев на виноградное сусло-желатину. Первая проба при брожении и колонии с желатины подвергалась микроскопированию. Затем из этого материала выделялись чистые культуры по общепринятому методу. И только те пробы, в которых при микроскопировании наблюдалось присутствие дрожжей и имело место брожение, учитывались как пробы, содержащие винные дрожжи.

Исследованием установлено нахождение винных дрожжей в почве круглый год. Хотя и реже, чем в почве, дрожжи встречаются на стволах и побегах, цветах, незрелых ягодах, листьях и почках (табл. 1). Зрелые ягоды содержат наибольшее количество дрожжевых клеток. Шулов нашел, что корень гороха в течение двух месяцев выделил 140 мг сахара, а в корневых выделениях 1 экземпляра кукурузы в тот же срок обнаружил 94 мг сахара и 80,6 мг яблочной кислоты. Машковцев установил, что корни риса за 11 дней выделяют органических веществ 20—30% от общего количества выделенных веществ. В корневых выделениях он обнаружил сахар, альдегид, этиловый спирт и др. По наблюдениям Гро, горох, конские бобы и люпин выделяют вещества, имеющие кислую реакцию (цитировано по Красильникову [3]). Красильникову удалось получить хороший рост дрожжей из группы Torula на корневых выделениях пшеницы и кукурузы. Приведенные литературные данные говорят о том, что высшие растения в результате своей жизнедеятельности обогащают почву органическими и неорганическими веществами, создавая тем самым благоприятные условия для жизни микроорганизмов в почве, в том числе дрожжей. Это положение, а также нахождение нами винных дрожжей в почве позволяют утверждать, что основным местом обитания дрожжей в природе является почва.

Таблица 1

Распространение дрожжей на растениях фруктового сада и виноградников

Объект исследования	Ствол и побеги		Почки		Листья		Цветы		Ягоды незрелые		Ягоды зрелые		Почва	
	Число посевов	Из них с возникшим брожением	Число посевов	Из них с возникшим брожением	Число посевов	Из них с возникшим брожением	Число посевов	Из них с возникшим брожением	Число посевов	Из них с возникшим брожением	Число посевов	Из них с возникшим брожением	Число посевов	Из них с возникшим брожением
Черная смородина .	24	1	24	0	6	0	6	0	6	1	16	4	15	9
Красная смородина .	24	2	3	0	6	0	6	1	6	0	18	7	10	4
Абрикос	18	3	3	0	6	1	6	1	6	0	6	4	9	5
Вишня	24	2	3	0	6	1	3	1	9	1	6	4	12	7
Виноград	36	8	6	1	15	2	9	2	18	3	38	38	48	16
	126	16	39	1	39	4	30	5	45	5	84	57	94	41

Морфолого-физиологическая характери

Название расы	Откуда выделена	Дата выделения	Форма клеток	Размер клеток (средн.) в μ	Почкование
Черносмородиновая II	Ягоды черной смородины	28.V 1947 г.	Овальная	3,69×2,34	Боков. полярн.
Вишневая III	Ягоды вишни	2.VIII 1945 г.	Овальная Удлинен.	8,29× ×3,35	Полярн. боков.
Вишневая IV	» »	6.VI 1945 г.	Овальн. Яйц. удлин.	4,04× ×2,02	Полярн. боков.
Малиновая V	Ягоды малины	8.VII 1946 г.	Округл. Овальн.	5,52× ×4,85	По всей поверхн.
Мускат белый VI	Ягоды винограда муск. бел.	22.VIII 1946 г.	Округл. Овальн.	4,82× ×4,69	Полярное
Черносмородиновая VIII	Ягоды черной смородины	26.VI 1946 г.	Овальн. Удлинен.	5,80× ×3,85	Полярное боковое
Малиновая VIII	Ягоды малины	8.VII 1946 г.	Округл. Овальн.	5,52× ×4,41	Полярн. боковое
Черемуховая IX	Ягоды черемухи	20.VII 1946 г.	Овальн. Кругл.	1,9× ×0,72	Полярн.
Почвенная XII	Почвы виноградника	31.III 1946 г.	Овальн. Округл.	2,64× ×3,52	Полярн.
Ежевичная XII	Ягоды ежевики	13.IX 1945 г.	Округл. Овальн.	2,64× ×3,52	Полярн. боков.
Абрикосовая XIII	Ягоды абрикос	8.VII 1946 г.	Овальн. Удлин.	8,56× ×3,31	Полярн.

Дрожжи в почве находятся круглый год, откуда с наступлением весны различными путями распространяются на растения.

В жаркие месяцы (июль-август) в почве открытых междурядий виноградников винных дрожжей было мало, но много их обнаружено в почве под кустами винограда, фруктового сада и огородов, прилегающих к виноградникам. Барановым они были найдены в зарослях древесных пород и кустарников.

Мы полагаем, что винные дрожжи широко распространены в природе (на можжевельниках, диких фруктовых деревьях, ягодах пасленовых и т. д.).

Нами выяснено, что винные подвалы на круговорот дрожжей в природе влияния не оказывают, так как исследования микрофлоры участка виноградника, прилегающего к винодельне, и участка, удаленного от винодельни на 2—3 км, давали одинаковые результаты.

С различных плодов и ягод и из почвы виноградника нами выделены 21 раса дрожжей.

Выделение и изучение морфолого-физиологических особенностей этих рас проводились общепринятыми методами микробиологии. Питательной средой было виноградное сусло (сахар 20—24%), кислотность — 7,3—5,4 ‰ без добавления или с добавлением желатины и агар-агара. Краткая характеристика наиболее интересных в производственном отношении рас приводится в табл. 2.

Путем лабораторных испытаний, химического анализа и дегустационной оценки нами отобрано и испытано в нормальных условиях виноделия 5 наиболее ценных для виноделия рас дрожжей. Параллельно испытывалась широко применяемая раса Штейнберг 93 г.

Таблица 2

стика выделенных рас дрожжей

Число спор	Разжижение желатины	Пленка	Кольцо	Осадок	Сбраживание сахаров						Кондиции виноградн. сока		Данные хим. анализа		Общая оценка
					глюкоза	рафиноза	сахароза	мальтоза	лактоза	виноградн. сусло	сахар в %	кислотность в ‰	спирт в %	кислотность в ‰	
1—2	—	—	—	Зернист.	+	+	+	+	—	+	24,2	5,4	13,9	5,8	7,50
1—2	—	—	—	Мелкозернист.	+	+	+	Следы	—	+	24,2	5,4	13,5	5,6	7,45
1—3	—	—	—	Пылевидный	+	+	+	»	—	+	24,2	5,4	13,5	5,6	7,10
1—3	—	—	—	»	+	+	+	+	—	+	24,2	5,4	12,7	5,6	7,68
3—4	—	—	—	»	+	+	+	Следы	—	+	24,2	5,4	13,2	5,6	6,85
1—2	—	—	—	»	+	+	+	+	—	+	24,2	5,4	14,0	5,8	7,57
1—3	—	—	—	Комковато-чешуйчат.	+	+	+	+	—	+	24,2	5,4	13,7	5,7	7,90
1—3	—	+	—	Зернистый	+	+	+	Следы	—	+	24,2	5,4	14,1	6,0	8,75
1—3	—	—	—	»	+	+	+	»	—	+	24,2	5,4	14,1	5,7	7,75
1—2	—	—	—	Пылевидный	+	+	+	»	—	+	24,2	5,4	13,7	6,2	7,85
1—3	—	—	—	Мелкопластинчатый	+	+	+	»	—	+	24,2	5,4	13,3	6,0	8,17

Данные производственных испытаний приведены в табл. 3, из которой видно, что расы Черемуховая IX, Черносмородиновая II, Ежевич-

Таблица 3

Название расы	Кондиции виноградного сусла		Продолжительность брожения в днях	Результаты хим. анализа			Органолептическая оценка	Общая оценка
	сахаристость в %	кислотность в ‰		общ. кисл. в ‰	спирт в %	сахар в %		
Штейнберг 93	21,0	7,3	8	5,6	11,6	0,106	Вино мутное, резкое, свежее, неполноценное	7,2
Черносмородиновая II	21,0	7,3	8	6,1	10,66	0,080	Вино опалесцирует, приятный фруктовый аромат, мягкое, гармоничное (лучше 1-го)	7,48
Вишневая III	21,0	7,3	8	6,1	11,52	0,106	Опалесцирует, аромат хороший, но слабый, не гармоничная кислотность	7,1
Малиновая V	21,0	7,3	8	6,5	11,42	0,98	Опалесцирует, полнее предыдущих, но менее гармоничное	7,2
Черемуховая IX	21,0	7,3	8	6,5	11,72	0,080	Хорошо осветлившееся, аромат хороший, хересный тон, вино мягкое, гармонич. оригинальн., лучший образец	7,8
Ежевичная XII	21,0	7,3	8	6,0	11,20	0,084	Вино хорошо осветлившееся, свежее, полноценное	7,3

ная XII получили лучшую оценку, чем раса Штейнберг 93 г., а Вишневая III, Малиновая V не уступают по своим качествам последней.

Выводы

1. Винные дрожжи постоянно обнаруживались как в почве, так и на зрелых ягодах, стволах и ветвях, цветах и листьях древесных пород и ягодников.

2. Среди кустов винограда и в затененных местах фруктового сада винные дрожжи встречаются чаще и в большем количестве, чем в почве открытых мест.

3. Близость винодельни не оказывает влияния на дрожжевую микрофлору почвы, следовательно, винные подвалы не являются источником распространения дрожжей в природе.

4. Основным местом обитания винных дрожжей в природе является почва; из почвы они переносятся на стебли, листья, цветы и плоды различных растений. На зрелых плодах дрожжи размножаются наиболее интенсивно.

5. Дрожжевая микрофлора плодов и ягод может дать ценные расы дрожжей для виноделия, в чем мы убедились при наших исследованиях.

Всероссийский научно-иссл. ин-т виноградарства и виноделия и
Отдел физиологии Биологического ин-та при Ростовском гос. ун-те

Получено 13.III.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Бачинская А. А., Бургвиц Г. К. и Конокотина А. Г. Исследование виноградных дрожжей южного берега Крыма. Вест. виноделия Украины, № 1, 1937.
2. Зильберман С. Я. Выделение и стандартизация чистых культур дрожжей при производстве столовых вин в Орджоникидзевском крае. Тр. центральн. н.-иссл. энохимической лаборатории, вып. 1, 77, 1941.
3. Красильников Н. А. Микробиологические основы бактериальных удобрений. Изд. АН СССР, М.—Л., 1945.
4. Кудрявцев В. И. О самостоятельности видов Saccharomyces cerevisiae Meyen — Hansen и Saccharomyces ellipsoideus Rees — Hansen. Микробиология, XV, 521, 1946.
5. Надсон Г. А. Как попадают дрожжи на ягоды виноградника. Вестн. виноделия Украины, № 6, 1927.
6. Саенко Н. Ф. К вопросу о круговороте дрожжей. Изд. Всесоюзного института виноградарства и виноделия, вып. 2, Тбилиси, 1932.
7. Саенко Н. Ф. и Джулабишвили Р. Изучение источников распространения дрожжей на винограднике. Н.-иссл. институт виноградарства и виноделия, 1938.
8. Фролов-Багреев А. Ф., Рябченко И. М., Клоц Э. Я. Микроорганизмы плодово-виноградных сусел и вин. М.—Л., 1933.
9. Чистович Т. А. К вопросу о выделении и изучении чистых культур дрожжей Анапского района. Краснодар, 1929.

ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА ПРОСА, ПЕРЕЗИМОВАВШЕГО В ПОЛЕ

А. В. Ромакина

Эпифитная микрофлора весьма тонко отражает состояние зерна, и по ее изменению можно составить суждение о его качестве. Однако имеющиеся к настоящему времени данные по количественному и качественному составу микрофлоры зерна были получены для ограниченного ассортимента продуктов, главным образом для пшеницы, ржи и овса (Беккер [1], Раутенштейн [6], Трисвятский [8] и другие).

Что касается микрофлоры проса, то ее состав к настоящему времени не уточнен.

Известно, что перезимовавшее в поле просо при употреблении в пищу вызывало в некоторых случаях чрезвычайно неприятные последствия. Выяснением причин этого явления занимались главным образом микологи, изучавшие развитие токсигенных грибов в перезимовавшем зерне, а также исследователи, разрабатывавшие методику диагносцирования токсических свойств зерна (Саркисов [7], Пидопличка и Билай [5] и другие).

Наши исследования были направлены на выяснение состава микрофлоры проса, своевременно убранного с поля (доброкачественного) и перезимовавшего в поле, обозначаемого далее недоброкачественным. Образцы проса для исследования с паспортом были получены из различных мест.

При исследовании проса мы учитывали общее число микробов Bact. herbicola, спороносных бактерий и их видовой состав, плесневые грибы, развивающиеся на сусловом агаре, титр кислотообразующих и газообразующих бактерий.

Для количественного и качественного определения бактерий навеска исследуемого образца в 5 г помещалась в колбочку с 45 мл стерильной водопроводной воды и тщательно взбалтывалась в течение 15 минут. Из полученного смыва с зерна делался посев в чашки Петри на МПА и сусловый агар.

Для определения спорообразующих бактерий производился посев пастеризованного при 80° в течение 15 минут смыва на среду, состоящую из 50% МПА и 50% суслового агара. Данная среда рекомендуется Мишустиным для учета бациллярных форм, так как на ней колонии имеют весьма характерный вид.

Для определения титра газообразующих и кислотообразующих бактерий разведения засевались в жидкую среду Эйкмана. Посевы выращивались при 25°.

Результаты исследования 18 образцов доброкачественного проса и 12 образцов недоброкачественного проса показали (табл. 1), что в доброкачественном просе имелось в среднем 270 тыс. бактерий (минимум 18 тыс. и максимум 1 300 тыс. на 1 г проса), в недоброкачественном просе — в среднем 3 550 тыс. (минимум 20 тыс. и максимум 28 млн. на 1 г проса). Таким образом, количество бактерий на 1 г недоброкачественного проса в среднем превышает количество бактерий на 1 г доброкачественного до 13 раз.

Тем не менее имеющийся в каждой из исследуемых групп проса

диапазон колебаний количества бактерий на 1 г проса в отдельных случаях, как мы видим, чрезвычайно широк. Нередко хорошее просо более богато обсеменено микрофлорой, чем порочное. Это не позволяет использовать общее число бактерий как показатель качества проса.

Таблица 1

Бактериальная флора в доброкачественном и недоброкачественном просе

№ п/п.	Доброкачественное просо		Недоброкачественное просо	
	общее число бактерий на 1 г проса	Bact. herbicola в %	общее число бактерий на 1 г проса	Bact. herbicola в %
1	126 000	100	20 000	5
2	132 500	85	28 000	0
3	18 000	80	412 000	5
4	224 000	98	230 000	0
5	166 000	98	34 200	0
6	42 000	100	4 000 000	0
7	31 000	85	37 200	0
8	28 000	85	28 000 000	0
9	746 000	30	826 000	10*
10	1 250 000	50	2 289 000	40*
11	300 000	60	1 642 500	30*
12	1 300 000	98	1 683 000	40*
13	126 000	50	—	—
14	32 800	20	—	—
15	37 775	25	—	—
16	38 000	40	—	—
17	100 250	98	—	—
18	166 000	75	—	—
Среднее	270 000	70	3 550 000	11
Миним.	18 000	20	20 000	0
Максим.	1 300 000	100	28 000 000	40

* Образцы проса с меньшим сроком хранения.

Из таблицы видно, что доминирующим или весьма богато представленным видом в доброкачественном просе является Bact. herbicola, число зародышей которого доходит в среднем до 70% от общего количества бактерий.

Аналогичные результаты были получены и при изучении пшеницы (Трисвятский [8], Раутенштейн [6], Подъяпольская [4], Чумак [9], Мишустин и Мирзоева [2, 3] и другие). Указанные исследователи наблюдали вытеснение Bact. herbicola другими микроорганизмами в условиях, неблагоприятных для хранения зерна. Аналогичное явление отмечается и в просе. Все эти результаты позволяют нам рассматривать Bact. herbicola как показательный организм доброкачественности проса.

Одновременно с угнетением Bact. herbicola в просе, перезимовавшем в поле, значительно повышается количество спороносных бактерий (табл. 2).

Количество спороносных бактерий в доброкачественном просе равно в среднем 500, в недоброкачественном — 9 200 на 1 г проса. Более характерным, однако, является то, что по видовому составу в доброкачественном просе превалирует Bac. megatherium. В недоброкачественном же просе Bac. megatherium вытесняется Bac. mesentericus, число зародышей которого повышается до 90% и даже выше от общего количества спороносных бактерий. В нормальном зерне число зародышей

картофельной палочки не превышает в среднем 6% от общего числа бациллярных форм. Чаще же здесь мы встречаем нулевые показатели.

Таблица 2

Количественный и качественный состав спорообразующих бактерий в доброкачественном и недоброкачественном просе

№ п/п.	Доброкачественное просо				Недоброкачественное просо			
	общее число спороносных бактерий на 1 г проса	видовой состав в %			общее число спороносных бактерий на 1 г проса	видовой состав в %		
		Bac. megatherium	Bac. mesentericus	Bac. mycoides		Bac. megatherium	Bac. mesentericus	Bac. mycoides
1	90	100	0	0	1 115	0	100	0
2	550	100	0	0	330	0	100	0
3	275	100	0	0	49 400	0	100	0
4	10	100	0	0	1 100	10	90	0
5	0	0	0	0	1 400	10	90	0
6	40	100	0	0	7 000	10	90	0
7	550	80	0	20	10 000	0	100	0
8	280	100	0	0	17 400	0	100	0
9	885	80	0	20	120	0	100	0
10	100	100	0	0	7 750	0	100	0
11	2 150	70	20	10	150	0	100	0
12	930	100	0	0	14 500	0	100	0
13	1 100	80	10	10	—	—	—	—
14	700	80	20	0	—	—	—	—
15	550	70	30	0	—	—	—	—
16	900	80	20	0	—	—	—	—
17.	0	0	0	0	—	—	—	—
18	95	100	0	0	—	—	—	—
Средн.	ок. 500	90	6	4	9 200	2,5	97,5	0
Миним.	0	70	0	0	120	0	90	—
Максим.	2 150	100	30	20	49 000	10	100	—

Таким образом, мы видим, что в недоброкачественном просе резко меняется соотношение различных видов спороносных бактерий. Данный признак является наиболее характерным для суждения о качестве проса.

На длительно хранящейся пшенице Беккер [1] было также обнаружено значительное количество Bac. mesentericus и микрококки. По данным Мишустина и Мирзоевой [2, 3], при самонагревании зерна в нем сильно развиваются спороносные бактерии и главным образом Bac. mesentericus, в то же время почти исчезают неспороносные бактерии и плесневые грибы. Следует отметить, однако, что при термогенезе создаются специфические условия, не переносимые на зерно, хранящееся в поле.

Переходя к рассмотрению результатов, полученных при исследовании плесневых грибов (Aspergillus, Penicillium, Mucor), мы видим значительное повышение их числа в недоброкачественном просе, что связано с хранением его при повышенной влажности (табл. 3). Это подтверждается данными Подъяпольской [4], Беккер [1] и других исследователей.

Из полученных данных видно, что в недоброкачественном просе число колоний плесневых грибов равно в среднем 40 тыс., в доброкачественном — 290.

Результаты, полученные при определении титра газообразующих и кислотообразующих бактерий на доброкачественном и недоброкачественном просе, показаны в табл. 4.

Таблица 3

Количественный и качественный состав плесневых грибов в доброкачественном и недоброкачественном просе

№ п/п.	Доброкачественное просо		Недоброкачественное просо	
	Число колоний на 1 г проса	Родовой состав	Число колоний на 1 г проса	Родовой состав
1	90	Penicillium	1 150	Mucor, Penicillium
2	200	Mucor, Penicillium	3 200	» »
3	0		2 850	» Aspergillus, Penicillium
4	20	Mucor	3 000	Mucor, Aspergillus
5	150	» Penicillium	200	» Penicillium
6	135	Penicillium	160	Aspergillus, Penicillium, Mucor
7	1 670	Mucor	900	Aspergillus, Penicillium, Mucor
8	325	» spinosus	300 000	Penicillium
9	600	»	18 000	Mucor, Aspergillus
10	600	Aspergillus	37 600	» »
11	20	Penicillium	340	» »
12	125	»	114 600	»
13	40	Mucor	—	—
14	65	Penicillium, Aspergillus	—	—
15	270	» »	—	—
Средн.	290		40 200	
Миним	20		160	
Максим.	1 670		300 000	

Таблица 4

Титр газообразующих и кислотообразующих бактерий в доброкачественном и недоброкачественном просе

№ п/п.	Доброкачественное просо			Недоброкачественное просо		
	титр бактерий на среде Эйкмана	титр газообразующих бактерий	титр кислотообразующих бактерий	титр бактерий на среде Эйкмана	титр газообразующих бактерий	титр кислотообразующих бактерий
1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0	0,0001
2	0,0001	0	0,001	0,001	0	0,001
3	0,001	0	0,01	0,0001	0	0,0001
4	0,001	0	0,001	0,0001	0	0,0001
5	0,0001	0	0,01	0,001	0	0,001
6	0,0001	0	0,001	0,0001	0	0,0001
7	0,0001	0	0,01	0,0001	0,001	0,0001
8	0,01	0	0,01	0,0001	0,01	0,0001
9	0,0001	0,01	0,01	0,0001	0,0001	0,0001
10	0,0001	0,001	0,001	0,0001	0,0001	0,0001
11	0,0001	0	0,01	0,0001	0,0001	0,001
12	0,0001	0	0,1	0,0001	0,0001	0,0001
13	0,001	0	0,01			
14	0,01	0	0,01			
15	0,01	0	0,01			
16	0,01	0	0,01			
17	0,0001	0	0,001			
18	0,0001	0	0,01			

При рассмотрении таблицы мы видим, что кислотообразующие бактерии несколько богаче представлены на недоброкачественном просе, тем не менее полученные отличия не столь резки, и вряд ли отмеченная группа микробов может быть использована для характеристики качества зерна.

Газообразующие бактерии обнаруживаются в недоброкачественном и нормальном просе лишь периодически и поэтому не могут служить показательными микроорганизмами.

В результате наших исследований мы констатируем, что наиболее характерным для эпифитной микрофлоры перезимовавшего в поле проса является резкое снижение числа бактерий из группы Bact. herbicola и сильное развитие спороносных бактерий.

Из спорообразующих бактерий в доброкачественном просе наиболее богато представлен Bac. megatherium; в порочном зерне этот микроб сменяется Bac. mesentericus, который превалирует над другими спорообразующими бактериями, повышаясь до 90% и более от состава всей спорообразующей микрофлоры.

Таким образом, можно сказать, что основным показателем доброкачественного (своевременно убранного с поля) проса может служить Bact. herbicola и показателем недоброкачественного (перезимовавшего в поле) проса может быть Bac. mesentericus.

Данная работа проводилась при консультации профессора Е. Н. Мишустина.

Выводы

1. Качественный состав эпифитной микрофлоры доброкачественного, своевременно собранного с поля проса характеризуется преобладанием Bact. herbicola. Число этого вида достигает в среднем 70% от общего числа бактерий.

2. На просе, перезимовавшем в поле, Bact. herbicola вытесняется другими микроорганизмами; при этом отмечается значительное увеличение количества спорообразующих бактерий. Меняется не только соотношение неспороносных и спороносных бактерий, но соотношение видового состава последних: на смену Bac. megatherium, присутствие которого характерно для полноценного зерна, появляется Bac. mesentericus.

3. На просе, перезимовавшем в поле, значительно увеличивается число плесневых грибов.

4. Кислотообразующие бактерии в просе, перезимовавшем в поле, обнаруживаются в несколько большем числе, чем в просе, своевременно убранном с поля. Количество газообразующих бактерий в недоброкачественном просе изменяется не характерно.

5. На основании полученных результатов можно сказать, что основным показателем доброкачественного (своевременно убранного с поля) проса может служить Bact. herbicola и показателем недоброкачественного (перезимовавшего в поле) проса — Bac. mesentericus.

Научно-исследовательский
санитарный институт
им. Эрисмана
Москва

Получено 28.XI.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Беккер З. Влияние аутоконсервации зерна пшеницы на его микрофлору, Бот. журн., 19, 126, 1934.
2. Мирзоева В. А. Причины обогащения зерна и муки картофельной палочкой. Микробиология, VIII, вып. 6, 1939.
3. Мишустин Е. Н. и Мирзоева В. А. Изучение причин заражения зерна картофельной палочкой и выработка мер борьбы с этой болезнью. Отчет Всесоюзного научно-исследовательского института зерна, 1936—1938 гг.

4. Подъяпольская О. П. Влияние температуры и влажности на развитие и изменение видового состава микрофлоры хранящегося зерна. Отчет Всесоюзного научно-исследовательского института зерна, 1938.
5. Пидопличка Н. М. и Билай В. И. К характеристике ферментативного аппарата токсических грибов на зерне хлебных злаков. Академия Наук УССР, 1946.
6. Раутенштейн Я. И. Микробиологические процессы при послеуборочном дозревании, сушке и хранении пшеничного зерна комбайновой уборки. Микробиология, т. VIII, вып. 2, 1939.
7. Саркисов А. Х. Метод определения ядовитости перезимовавших в поле зерновых культур, Журн. «Гигиена и санитария», № 9, 1944.
8. Трисвятский Л. А. Микроорганизмы зерна и муки. Заготиздат, Москва, 1941.
9. Чумак М. Д. Изучение путей заражения муки картофельной палочкой. Отчет Всесоюзного научно-исследовательского института зерна, 1938.

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ СТРЕПТОКОККОВОГО БАКТЕРИОФАГА В СЫРАХ

Е. В. Рунов

Вопрос о распространенности бактериофага молочнокислых стрептококков в сырах не освещен в литературе, в то же время он представляет большой интерес в связи с выяснением значения бактериофагии в сыроделии. С этой целью нами было проведено массовое обследование различных видов сыров отечественного производства.

Исследованию по единой методике подверглось 67 образцов сыров в возрасте от 2 месяцев до 4 лет. Навески сыра (в 20—30 г) растирались в ступке с последующим добавлением нагретой до 45° воды. Отношение сыра к воде было — 1 : 2,5. Жидкая масса сливалась в стерильный сосуд и оставлялась на 18—20 часов при температуре 4—10°. При всех операциях строго соблюдались правила асептики. При получении фильтратов из сыров с нежной мажущейся консистенцией для осаждения белков применялось подкисление сырной болтушки молочной кислотой. Жидкость после фильтрования через стерильный бумажный фильтр фильтровалась через фильтр Зейтца. Фильтрат всегда получался прозрачным, лишь иногда с легкой опалесценцией.

Опыты с определением наличия бактериофага в фильтрате ставились в пробирках. К 9 мл стерильного молока добавлялся 1 мл фильтрата. После перемешивания среда заражалась 1 петлей свежей культуры высокочувствительных к бактериофагу стрептококков. Одновременно ставился контрольный вариант: стрептококки без фильтрата. Параллельно проверялась стерильность фильтрата (вариант без заражения). Через 12 часов культивирования при 35° производилось микроскопирование и определение кислотности. Критерием силы действия бактериофага в фильтратах служило наличие лизиса стрептококков и разница в кислотности по сравнению с контролем.

Во всех случаях кислотность в культурах с фильтратами была меньше, чем в контроле. Разница в кислотности позволяет до некоторой степени судить об активности бактериофага в сыре. По содержанию бактериофага сыры можно разбить условно на пять групп, фильтраты которых дали снижение кислотности по отношению к контролю.

I группа — на 30—40% (+);

II » — » 40—50% (++);

III » — » 50—60% (+++).

IV » — » 60—70% (++++);

V » — выше 70% (+++++).

Суммарно активность бактериофага в сырах распределялась по группам следующим образом (табл. 2).

Как мы видим, во всех исследованных образцах сыров содержался бактериофаг независимо от вида и возраста сыра, а также независимо от того, был ли он выработан из пастеризованного или сырого молока.

Таблица 1

Вид сыра	Выработка из молока	Возраст сыра (в мес.)	Наличие бактериофага	Активность фильтрата бактериофага
Ярославский	Пастеризованного	4	+	++++
»	»	12	+	++
»	»	8	+	++++
»	»	2	+	++++
»	»	2	+	++++
»	»	3	+	+
»	»	3	+	+++
»	»	3	+	+
»	»	2	+	++++
»	»	10	+	+++
»	«	11	+	++++
»	»	4	+	++++
Голландский брусковый	Сырого	8	+	++++
» »	»	13	+	++++
» » тощий	»	4	+	+
» »	»	4	+	++++
» »	»	5	+	++++
» »	»	5	+	++++
» круглый	»	3	+	++++
» »	»	3	+	+++
» »	»	3	+	+
» »	»	3	+	++++
» »	»	3	+	++++
» »	»	5	+	++++
» »	»	4	+	++++
» »	»	3	+	++++
» »	»	3	+	++
» »	»	3	+	+++
» »	»	4	+	++++
» »	»	13	+	++++
» »	»	5	+	++++
» »	»	4	+	+++
» »	»	8	+	++++
» »	»	6	+	++++
» »	»	14	+	++++
Гауда	Пастеризованного	3	+	++++
»	»	3	+	+++
»	»	3	+	++++
»	»	3	+	+++
»	»	3	+	++++
»	»	3	+	+
»	»	30	+	+
Волжский	»	5	+	+

Таблица 1 (продолжение)

Вид сыра	Выработка из молока	Возраст сыра (в мес.)	Наличие бактериофага	Активность фильтрата бактериофага
Волжский	Пастеризованного	4	+	+
»	»	3	+	+++
»	»	3	+	++++
»	»	2	+	+
Угличский	»	6	+	+++++
Тильзит	»	2	+	+++
»	»	4	+	++++
»	»	3	+	++
Советский	»	2	+	++++
»	»	3	+	+++
»	Сырого	14	+	++++
»	Пастеризованного	30	+	++++
»	»	12	+	+
»	»	3	+	++++
»	»	4	+	+++++
»	»	48	+	++
Камамбер	»	2	+	+++
Чеддер	»	5	+	++
»	»	4	+	++++
»	»	3	+	+++
»	»	3	+	++
Швейцарский	Сырого	ок. 24	+	+++++
»	»	» 24	+	+++++
»	»	» 24	+	+++++
»	»	» 24	+	++++

Таблица 2

Группа	Активность	Количество сыров в %
I	+	14,7
II	++	8,8
III	+++	16,2
IV	++++	30,9
V	+++++	29,4

При этом в большинстве сыров наблюдалось наличие высокоактивного бактериофага.

Выводы

Бактериофаг молочнокислых стрептококков широко распространен в сырах. Он, очевидно, является постоянным фактором среды в сыре.

Всесоюзный научно-исследовательский институт сыродельной промышленности г. Углич

Получено 3.X.1948

ПЕРЕДАЧА «ИЗРАСТАНИЯ» СЕМЕННОЙ КАПУСТЫ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ

Г. В. Артемьев

«Израстание» кочанной капусты — заболевание, широко распространенное в Карагандинской и Акмолинской областях и проявляющееся только на семенниках, т. е. растениях 2-го года жизни.

В фитопатологической литературе указание на это заболевание и его описание имеется лишь у Рыжкова [4]. Внешние признаки заболевания, как это было подмечено уже указанным автором, весьма напоминают столбур томатов и выражаются в позеленении, автолизе и пролиферации цветов, т. е. необратимой замене генеративных органов особыми образованиями вегетативного типа. Эти последние сохраняют в атрофированном виде некоторые черты строения нормального цветка или завязи и придают пораженным растениям характерный разросшийся и курчавый вид.

Кроме культурной капусты, поражения, совершенно аналогичные израстанию, отмечаются также на широко распространенном в местных условиях крестоцветном сорняке — хренолистной капусте (Brassica armaraceoides).

Сопровождаясь частичной или полной семенной непродуктивностью пораженных растений, заболевание, поражая в некоторые годы до 90 и даже 100% растений, приносит значительные убытки семеноводческим хозяйствам в указанных областях. Вопрос о природе заболевания до последнего времени оставался открытым.

Никаких специфических грибных или бактериальных микроорганизмов на пораженных растениях обнаружить не удавалось. Попытки заражения здоровых растений соком больных закончились неудачей. В то же время была подмечена связь между развитием заболевания и погодно-метеорологическими условиями во время формирования кочанов на 1-м году жизни и во время цветения семенников растений 2-го года.

Оказалось, что если эти фазы развития растений приходятся на период высоких температур и низкой относительной влажности (т. е. в местных условиях на июнь-июль), то процент пораженных растений бывает выше, израстание проявляется раньше и приносит бóльшие убытки, чем в годы с прохладным и влажным летом.

Все это в связи с имеющимися литературными указаниями на случаи сезонного израстания цветной капусты на Черноморском побережье Кавказа (Третьяков [6]) привело к представлению о том, что израстание является функциональным заболеванием и что причиной его служат неблагоприятные экологические условия (Русанова [1]).

Однако патоморфогенез происходящих при израстании изменений является чрезвычайно характерным для вирусных заболеваний типа желтух. Примером подобных заболеваний может служить столбур томатов, вирус которого Lycopersicum virus 5 является возбудителем подобных же заболеваний многих культурных и дикорастущих представителей из различных растительных семейств (Рыжков [2, 3, 4], Сухов и Вовк [5]).

Внешняя картина заболевания кочанной капусты израстанием позволила нам предположить не функциональную, а инфекционную, вирусную природу болезни.

Известно, что при подозрении на вирус и неизученности естественных путей передачи заболевания в природе решающим доказательством инфекционности является передача болезни здоровому подвою при трансплантации на него привоя пораженного растения.

Первые опыты прививок здоровых растений больными были осуществлены автором в 1944 г. В связи с отсутствием ко времени оживления семенников капусты перезимовавших израстающих растений было решено использовать в качестве подвоя не семенники, а рассаду с тем, чтобы вырастить из нее кочаны и, высадив их в следующем году, убедиться в положительном или отрицательном эффекте прививки.

Прививка растений 1-го года жизни (а не непосредственно семенников) представлялась тем более целесообразной, что в природных условиях израстание часто проявляется чрезвычайно рано, с первых же этапов развития семенника. Это наводило на мысль о том, что если заболевание является инфекционным, то для столь раннего проявления болезни на 2-м году жизни заражение должно происходить на 1-м году.

Рассада капусты «Слава» в стадии 3—5 листочков, культивировавшаяся в горшках в условиях изоляции от насекомых в вегетационном домике, прививалась в пазушную почку такой же почкой с израстающего семенника. После приживления прививки рассада высаживалась из горшка в парники, где и оставалась до конца вегетационного периода и сформирования кочана.

Прививки производились в конце июня — начале июля, т. е. когда вполне обозначились наиболее типичные случаи израстания на семенниках в полевых условиях. Привитая рассада образовала очень слабые кочаны, многие из которых при хранении погибли. До весны сохранилось всего 12 кочанов, из них 4 — от неудавшихся прививок, 2 — от прививок, погибших спустя 10—12 дней после трансплантации, и 6 — от прижившихся и тронувшихся в рост прививок.

В 1945 г. сохранившиеся кочаны — 12 прививавшихся и 10 контрольных (выращивавшихся в одинаковых с привитыми условиях) — были в апреле оживлены, а 2 мая высажены в вегетационном домике в деревянные ящики, набитые землей. Уже к 15—20 июня все 6 кочанов от прижившихся прививок дали типичное израстание развившихся от них семенных растений, сопровождавшееся чрезвычайно глубокими нарушениями генеративных органов: полной редукцией завязей с образованием на них асцидиеподобных выростов на листочках — аналогах семян, растрескиванием завязей и пр. (рисунок).

Из 2 кочанов от погибших спустя некоторое время прививок один семенник вначале образовал нормальные цветы, а затем израс, а стручья, образовавшиеся из его нормальных цветов, оказались со щуплыми, невсхожими семенами. Второй семенник при внешне нормальном цветении дал четковидные стручья без семян. Из 4 кочанов от неудавшихся прививок 3 дали нормальные семенники, а один — семенник с четковидными стручьями. Контрольные кочаны ни в одном случае израстания не дали.

В 1945 г. прививки были повторены, но несколько позже — в конце июля, начале августа. Для прививок, чтобы устранить предполагаемое влияние экологического фактора, использовалась рассада, полученная от поздних летних посевов. Как и в 1944 г., большинство рассады с прижившимися прививками образовало рыхлые, невыполненные кочаны с удлиненными междуузлиями. Лишь на верхушках кочерыг образовалась группа заворачивающихся листьев, напоминающих кочан. Многие из привитых почек тронулись в рост и образовали довольно мощный боковой побег, также кончающийся на верхушке рыхлым кочаном.

Тогда же, в 1945 г., несколько растений капусты были привиты черенками с израстающей хренолистной капусты.

К посадке в 1946 г. сохранилось 18 кочанов от прижившихся приви-

вок культурной израстающей капусты и 4 кочана от привитых хренолистной капустой. Все привитые растения в 1946 г. изросли. При этом из 18 растений, привитых черенками израстающих семенников кочанной капусты, с самого начала изросло 4 штуки (22%) и несколько позже, образовав вначале нормальные цветы,— 14 штук (78%). Из 4 растений, привитых хренолистной капустой, с самого начала изросло 3 семенника, а один изрос к концу вегетационного сезона.

Полная редукция завязи при «израстании» семенной капусты. Видны тычинки у основания завязи и асцидиеподобные выросты на ней

Таким образом, результаты прививок показали передаваемость израстания семенников капусты при трансплантации пораженного привоя на здоровый подвой, т. е. полностью подтвердили предположение об инфекционном, вирусном происхождении заболевания.

В наиболее полном списке фитопатогенных вирусов, приводимом Рыжковым [2, 3], имеются указания на 5 вирусов, поражающих крестоцветные:

Brassica virus I Smith	Передается соком и тлями, вызывает кольцевую пятнистость капусты
» » 2 Hog. and Johns	Передается соком и тлями, вызывает мозаику турнепса
» » 3 Tompk.	Передается соком и тлями, вызывает мозаичную болезнь цветной капусты
» » 4 Clayt.	Передается соком и тлями, вызывает мозаику крестоцветных
» » 5 Lavs. and Walk.	Передается соком и тлями, вызывает некротическую пятнистость листьев капусты

Как по отсутствию способности передаваться соком, так и по внешней картине вызываемого заболевания вирус израстания семенников, таким образом, отличается от приведенных выше.

До возможной идентификации вируса израстания с другими (некрестоцветными) вирусами (вероятнее всего с вирусом столбура томатов — Lycopersicum virus 5 Sam. Bald and Eardley) мы предлагаем присвоить этому вирусу название Brassica virus 6.

Выводы

1. Израстание семенной капусты, повидимому, является не функциональным, а инфекционным, вирусным заболеванием.

2. Заболевание не передается соком, а передается при трансплантации.

3. Особенности изменений, происходящих при заболевании, характерных для вирусных заболеваний типа желтух, не позволяют идентифицировать вирус израстания семенной капусты с описанными вирусами крестоцветных (Brassica virus 1—5), вызывающими заболевание типа мозаики.

4. Это дает основание предложить присвоить вирусу израстания капусты название Brassica virus 6.

Карагандинская сельскохозяйственная опытная станция

Получено 5.X.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Русанова А. П. Летние посадки капусты как способ борьбы с израстанием семенников. Бюлл. Караганд. с.-х. опытной станции, № 1, 1945.
2. Рыжков В. Л. Вирусные болезни растений. Москва, 1935.
3. Рыжков В. Л. Основы учения о вирусных болезнях растений, Москва, 1944.
4. Рыжков В. Л. Фитопатогенные вирусы. Москва, 1946.
5. Сухов К. С. и Вовк А. М. Столбур картофеля. Доклады ВАСХНИЛ, № 1—2, 1946.
6. Третьяков М. С. К биологии цветения цветной капусты. Адлерская овощная опытная станция, Адлер, 1941.

БУТИЛЕН-ГЛИКОЛЬ И ЕГО ОБРАЗОВАНИЕ В ПРОЦЕССАХ БРОЖЕНИЯ

Обзор

Н. В. Дудыкина

2,3-бутилен-гликоль ($CH_3 — CHOH — CHOH — CH_3$) до недавнего времени был известен лишь как лабораторный реактив, получаемый довольно сложным химическим путем. В последние, особенно военные годы интерес к данному веществу в сильной мере возрос, что связано главным образом с возможностью получения из него бутадиена — исходного продукта для производства синтетического каучука; не меньшую ценность 2,3-бутилен-гликоль и его производные могут, однако, представлять и для других отраслей химической промышленности, как текстильной, лакокрасочной, фармацевтической, промышленности растворителей, пластических смол. Поэтому в последнее время литература по бутилен-гликолю значительно увеличилась, несмотря даже на некоторую ограниченность публикаций в этой области.

Способность к образованию 2,3-бутилен-гликоля свойственна большому количеству микроорганизмов, главным образом бактерий, принадлежащих к трем большим семействам Enterobacteriaceae, Bacillaceae и Pseudomonadaceae. Из них наибольшую практическую ценность имеет бактерия Aerobacter aerogenes, способная сбраживать все простейшие моно- и дисахара с образованием 2,3-бутилен-гликоля. По своему характеру это брожение близко к гомоферментативному. Суммарное уравнение распада сахара под воздействием данной бактерии следующее: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3CHOH — CHOH — CH_3 + 2CO_2 + H_2$; максимальный теоретический выход бутилен-гликоля составляет при этом 50% от сброженного сахара. С культурой Aerobacter aerogenes (штамм 766 и 199) в США в последние годы было организовано производство бутилен-гликоля в масштабе больших опытных заводов (штаты Пеория, Кентукки, Индиана).

Не менее практически ценна и другая, образующая бутилен-гликоль бактерия — Aerobacillus polymyxa; она содержит амилазу и способна сбраживать с образованием 2, 3-бутилен-гликоля различные крахмалсодержащие среды по следующей схеме:

$$5C_6H_{12}O \rightarrow 3CH_3 — CHOH — CHCH — CH_3 + 4CH_3 — CH_2OH + 10CO_2 + 3H_2.$$

Максимальный теоретический выход бутилен-гликоля при этом брожении несколько меньше и составляет 30% от сброженного сахара. С применением Aerobacillus polymyxa (культура C42) в Канаде, например, было организовано производство 2,3-бутилен-гликоля из зерна в полузаводских условиях.

2,3-бутилен-гликоль имеет в своей молекуле два асимметрических атома углерода (в отличие от других бутилен-гликолей, получаемых химическим путем и содержащих только один асимметрический атом углерода в молекуле) и может существовать в трех стереоизомерных формах: dextro, levo и meso. Строение различных изомеров бутилен-гликоля показано на следующем рисунке.

2,3-бутилен-гликоль представляет собой сладковатую на вкус, бесцветную, сильно гигроскопическую глицеринообразную жидкость, застывающую на холоду в бесцветную кристаллическую массу, плавящуюся при 19—25° и кипящую при 178—182°.

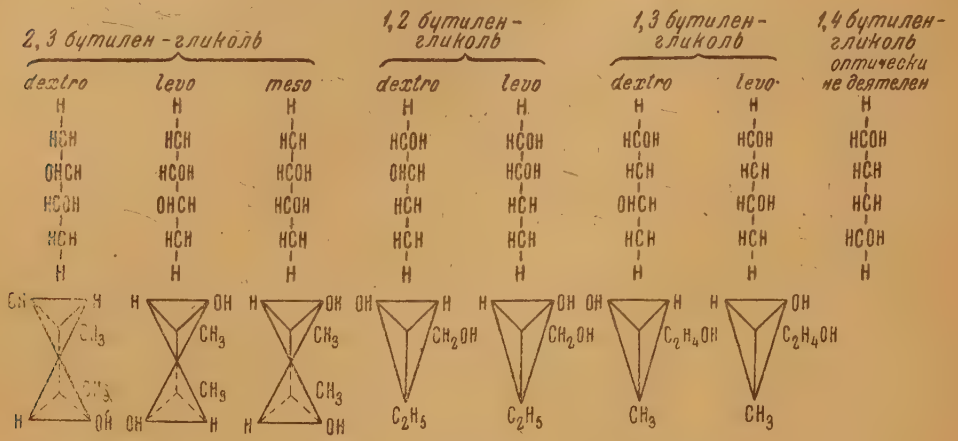


Рис. 1. Изомерия различных бутилен-гликолей

Физические свойства изомеров 2,3-бутилен-гликоля даны в следующей таблице.

	meso	levo	dextro	d. l смесь
Удельное вращение	0.0	—13,3	+13,3	0,0
Температура плавления	34°	18°	18°	8°
Температура кипения	182°	178°	178°	177°

Обычно бактериальные процессы образования 2,3-бутилен-гликоля сопровождаются образованием наряду с 2,3-бутилен-гликолем различных побочных продуктов, как ацетоин, этиловый спирт, глицерин, муравьиная, уксусная, янтарная и молочная кислоты. Количество бутилен-гликоля и указанных побочных продуктов может в сильной мере изменяться в зависимости от вида микроорганизма и условий брожения.

1. Возбудители брожения и условия образования 2,3-бутилен-гликоля

2,3-булитен-гликоль как продукт бактериального брожения был впервые обнаружен Harden и Walpole (1906) при выращивании Bact. lactis aerogenes (Escherich) на глюкозопептонной среде и манните. При исследовании продуктов брожения авторами установлено, что, помимо муравьиной, уксусной, янтарной и молочной кислот, этилового спирта, углекислоты и водорода, в культуральной жидкости содержалось еще новое вещество, застывающее на холоду в бесцветную кристаллическую массу, плавящуюся при 28°, с удельным вращением + 0,46 — 0,71° и температурой кипения 181—183°. Полученные производные — дифенилуретан с температурой плавления 197—198° и диацетил (окислением бромом на солнечном свету), а также данные элементарного анализа установили идентичность выделенного вещества с 2,3-бутилен-гликолем.

В дальнейшем было проведено более тщательное изучение «сырого гликоля». Для этого культуральная жидкость, полученная после выращивания в анаэробных условиях Bact. lactis aerogenes на глюкозе, была сгущена под вакуумом до густого сиропа, который фракциони-

рован под вакуумом; получена бесцветная, густая жидкость с температурой кипения 181—183°, с выходом около 14—15% по отношению к взятой глюкозе. Данные элементарного анализа и ряд производных (фенилозазон и диоксим из диацетила, дифенилуретан и др.) установили идентичность выделенного вещества с 2,3-бутилен-гликолем.

Harden и Norris (1912) исследовали образование 2,3-бутилен-гликоля и ацетоина у Bact. lactis aerogenes на средах, содержащих, помимо пептона, глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, арабинозу, изодульцит, глицерин, маннит. Во всех случаях авторы обнаружили в продуктах брожения 2,3-бутилен-гликоль и ацетоин.

Рядом других исследователей установлена способность образования 2,3-бутилен-гликоля культурой Aerobacter cloacae (syn. Bacillus cloacae Jordan). Эта бактерия по морфологическим и биохимическим признакам очень близка к Bact. lactis aerogenes (syn. Aerobacter aerogenes) и отличается от последней лишь подвижностью своих клеток. Для доказательства близости указанных видов было проведено параллельное сбраживание глюкозы и маннита обеими культурами; результаты анализа и данные углеродного баланса для обеих бактерий не указывают на какие-либо существенные различия между ними, кроме отмеченной уже выше подвижности клеток для Aerobacter cloacae и неподвижности их для Aerobacter aerogenes.

На основании ряда последующих исследований делается вывод, что все бактерии, дающие положительную эозиново-красную окраску с реактивом Voges — Proscauer (качественная проба на ацетоин), обычно образуют и 2,3-бутилен-гликоль, причем бактерии Aerobacter aerogenes и Aerobacter cloacae способны продуцировать последний в наибольшем количестве.

Lemoigne публикует ряд работ, посвященных образованию 2,3-бутилен-гликоля и ацетоина бактериями Bacillus subtilis и Bacterium proteus при культивировании их на глюкозе и сахарозе. Например, при выращивании Bacillus subtilis на сахарозе Lemoigne (1912) нашел, что количества бутилен-гликоля и ацетоина в течение брожения непрерывно меняются: к концу третьего дня, например, отношение ацетоина к 2,3-бутилен-гликолю составляло 1 : 2, к концу же семи суток оно изменилось до 1,6 : 1. При сбраживании глюкозы тремя штаммами Bacterium proteus Lemoigne (1923) нашел следующие количества ацетоина и 2,3-бутилен-гликоля (в миллиграммах).

	3 дня	6 дней	18 дней
Ацетоин	16	60	110
2, 3-бутилен-гликоль . .	60	140	50

С течением времени содержание бутилен-гликоля, а за ним и ацетоина постепенно уменьшалось и, наконец, сначала первый, а затем и второй совершенно исчезали из опытного раствора.

Из американской литературы 1930—1940 гг. следует отметить работы по образованию 2,3-бутилен-гликоля новыми видами бактерий, именно: Aerobacter faeni, Aerob. pectinovorum и Aerob. motorium.

При изучении действия Aerob. faeni на сахарозу и ксилозу было найдено, что данная бактерия дает те же самые продукты брожения, что и бактерия Aerobacter aerogenes, а именно: 2,3-бутилен-гликоль, ацетоин, спирт, углекислый газ, водород, муравьиную, уксусную и молочную кислоты.

При сбраживании сахарозы и ксилозы бактерией Aerobacter motorium в аэробных и анаэробных условиях выход бутилен-гликоля и ацетоина выражался в виде отношения полученных продуктов к 100 г сброженной глюкозы:

	Ксилоза		Сахароза	
	аэробн. условия	анаэробн. условия	аэробн. условия	анаэробн. условия
2,3-бутилен-гликоль	10,5	13,7	15,0	16,7
Ацетоин	6,4	22,6	6,4	0,5

Fulmer, Christensen, Kendall (1933) проводили брожение с Aerob. pectinovorum, оказавшейся по сравнению с Aerob. faeni и Aerob. motorium наиболее активной. Ими изучалось влияние концентрации сахарозы на выход бутилен-гликоля.

Брожение проводилось на среде, содержащей в 100 мл. NH_4Cl — 0,25 г, NaH_2PO_4 — 0,15 г, $CaCl_2$ — 0,15 г, $MgSO_4$ — 0,2 г и различные количества сахарозы; в опытный раствор (объем 200 мл) вносилась двухдневная маточная культура, выращенная на среде того же состава, с 6% сахарозы; pH периодическим внесением 1/1 М раствора соды поддерживался на уровне 6,0; брожение проводилось при 37,5°.

Приводим некоторые цифровые данные, полученные авторами:

Глюкоза, г/100	Сахароза, г/100	Сброжено в %	Время брожения в днях	Выход бутилен-гликоля в % от сброженн. глюкозы
2,00	1,97	99,0	4,0	43,1
8,00	7,91	99,0	18,0	46,9
9,00	8,41	93,0	23,0	—
10,00	8,8	88,0	23,0	46,7

Необходимо отметить, что выходы 2,3-бутилен-гликоля, определяемые авторами путем четырехдневной экстракции эфиром, с последующим выпариванием и взвешиванием продукта, являются несколько преувеличенными в силу недостатков применяемого весового метода.

В работе Kendall (1934) изучаются оптимальные условия образования 2,3-бутилен-гликоля при выращивании на сахарозе различных видов Aerobacter: pectinovorum, cloacae, двух штаммов Aerogenes. Исследовалось влияние концентраций сахара, pH среды, концентрации солей. Установлено, что оптимальная концентрация сахара равна 8%, pH — около 6,2, концентрация NH_4Cl — 0,3%, $MgSO_4$ — 0,175%, K_2HPO_4 — 0,175%, $CaCl_2$ — 0,1%. Выход бутилен-гликоля для всех исследованных бактерий был в основном одинаков и приближался к теоретическому (50%); здесь, как и в предыдущей работе, применялся весовой метод определения бутилен-гликоля, дающий повышенные результаты по сравнению с применяемыми в настоящее время объемными методами.

Необходимо отметить, что такие из указанных выше видов бактерий, как Aerobacter faeni, Aerob. pectinovorum и Aerob. motorium, в литературе в дальнейшем не упоминаются,— видимо, при детальной идентификации они оказались определенными культурами aerogenes или cloacae.

Значительные количества 2,3-бутилен-гликоля, образуемые некоторыми видами Aerobacter, способствовали появлению в 1930—1935 гг. первых двух патентов по получению 2,3-бутилен-гликоля брожением. По патенту Verhave (1930) осахаренный картофельный затор (3 000 кг) в присутствии известняка и суперфосфата сбраживался культурой Aerobacter aerogenes при продувании воздухом; в результате получено

235 кг 92% 2,3-бутилен-гликоля и 130 кг 95% этилового спирта, причем выход бутилен-гликоля составлял около 30% по отношению к потребленному углеводу. По патенту Kluyver и Schaffer (1933) осахаренный картофель или меласса, содержащие сульфат аммония, фосфат и карбонат кальция, сбраживались при продувании воздухом с помощью той же культуры Aerobacter aerogenes; получаемые при этом выходы продуктов, однако, не указываются.

К этому же периоду относится работа Первозванского и Шапиро (1941) — первых исследователей бутилен-гликолевого брожения в СССР. Авторы дают подробный литературный обзор вопроса и приводят некоторые экспериментальные данные по образованию 2,3-бутилен-гликоля в культурах Aerobacter aerogenes на глюкозе.

Брожение проводилось на среде следующего состава: глюкоза — 2—6 г, пептон — 1,0 г, NaCl — 0,5 г, $CaCO_3$ — 2,0 г, водопроводной воды — до 100 мл.

Маточная культура 1—2-суточного возраста вносилась в количестве около 1,5% от объема культуральной жидкости.

Результаты сведены авторами в следующей таблице.

Продукты брожения в культурах Aerobacter aerogenes

№ опыта	Количество культурал. жидкости в см³	Количество глюкозы в %	Время брожения в сутках	Колич. сброженной глюкозы в %	Количество продуктов брожения в % от сброженного сахара					
					спирт	ацетилметилкарбинол	бутилен-гликоль	летучие к-ты	молочная к-та	янтарная к-та
1	600	2,0	2	100	15,4	0,17	21,2	5,0	—	—
2	750	2,0	2	100	25,4	—	21,0	7,4	6,1	0,4
3	750	4,0	3	100	21,4	0,58	21,1	4,6	7,0	1,8
4	750	4,0	4	100	14,2	0,83	20,1	13,8	9,0	2,8
5	750	6,0	8	96,2	11,7	0,13	20,5	14,0	6,6	0,3

Таким образом, культуральная жидкость содержала 0,4—1,2 г бутилен-гликоля в 100 мл, выход бутилен-гликоля составлял 20—21% от потребленной глюкозы. При выделении бутилен-гликоля из бражки были испытаны методы отгонки с водяным паром, с перегретым паром и выделение путем экстрагирования, причем ни один из них не дал обнадеживающих результатов.

Дальнейшие исследования в этой области, проводившиеся под руководством Первозванского в 1940—1941 гг. в Академии Наук БССР (Кузьмин, Ивашкевич, Дудыкина), в связи с войной были прерваны.

Годы 1941—1946 характеризуются как у нас, так и за рубежом усиленными изысканиями в области эффективных путей получения синтетического каучука и, в частности, в области получения бутилен-гликоля как нового вида сырья для бутадиенового каучука. В Америке, оказавшейся в период войны отрезанной от своих баз натурального каучука, на разработку бактериального метода получения бутилен-гликоля, а из него — бутадиена, были направлены усилия многих научно-исследовательских институтов и компаний (до 24). В этот период из различных природных источников были выделены сотни образующих бутилен-гликоль бактерий как из рода Aerobacter, так и из рода Aerobacillus; с наилучшими из них проводилось изучение в широком масштабе всего процесса, начиная от сбраживания различных углеводных сред и кончая получением бутадиена.

В рукописном отчете компании Vulcan Copper and Supply подробно описывается лабораторный и полузаводский процесс получения бутилен-

гликоля с помощью двух наилучших культур Aerob. aerogenes (766 и 199). Указанными микроорганизмами проводилось сбраживание кукурузных заторов, гидролизованных 0,2 *N* серной кислотой под давлением более 4 атмосфер; после гидролиза серная кислота нейтрализовалась рассчитанным количеством углекислого кальция, pH доводился до 6,2 и затор разбавлялся водой до содержания в нем сахара, равного 10—12%; после внесения в разбавленный затор мочевины (или аммонийной соли) и мелового молока (0,5—1%) среда засевалась 20-часовой маточной культурой в количестве 5% по отношению к исходному объему; брожение проводилось при 30—32,5° в течение 36 часов при непрерывном перемешивании и в течение первых 24 часов — при продувании бродящей жидкости воздухом через специальные виды полотна (cloth spargers) или через мелкопористый материал «алоксит». Средний состав бражки, получаемой в полузаводских условиях при сбраживании 25 кг зерна (объем 152 л), был следующий: бутилен-гликоля — 4,15%, ацетоина — 0,15%, этилового спирта — 0,25%, сухого остатка — 6,7%. Таким образом, описанные условия брожения позволили получать в течение 1,5—2 суток бутилен-гликоля в количестве 6,3—6,75 кг из 25 кг зерна, что по отношению к крахмалу составляло выход в 39—42% (при теоретически возможном выходе в 50%).

В работе Perlman (1944) приводятся данные по получению 2,3-бутилен-гликоля сбраживанием гидролизатов различных пород древесины. Применяя культуру Aerobacter aerogenes, штамм 199, и метод брожения, описанный в приведенном выше отчете, автор сбраживал сгущенные древесные гидролизаты, содержащие до 17% сахара.

Выход бутилен-гликоля в смеси с ацетоином в лабораторных опытах достигал 35% по отношению к потребленному сахару. Автор указал, что проведение культуры через ряд пассажей на древесном гидролизате значительно повышало ее бродильную способность.

При проведении сбраживания в укрупненно-лабораторном масштабе (объем 12 л), а также при брожении в полузаводских условиях с аэрацией автор получил результаты, аналогичные лабораторным.

Torres и Flias (1944) получали бутилен-гликоль сбраживанием мелассы культурой Aerobacter aerogenes (штамм 199). По их методу меласса разбавляется до 13—14° Brix, pH раствора доводится до 6,0—6,2, маточная культура вносится в количестве 5% по объему, брожение продолжается в течение 36 часов при непрерывном перемешивании и в первые 24 часа при продувании воздухом со скоростью 0,18—0,2 м³ в минуту на 38 декалитров среды. При этом бражка обычно содержала 4,0% гликоля, 0,55% ацетоина и 0,45% спирта.

К этому же времени относится патент Christensen (1944a) на получение повышенных выходов 2,3-бутилен-гликоля: сбраживание с помощью культуры Aerobacter aerogenes проводится на средах, содержащих 10—27 г углевода на 100 мл бактериальной культуры; снижение концентраций сбраживаемого углевода не допускается ниже 6% — последний по мере потребления добавляется; pH поддерживается на уровне 5,5—6,0. Выходы продуктов, получаемых при этом, однако, не указываются. Второй его патент (1944b), еще более лаконичный, чем первый, говорит о сбраживании с помощью той же культуры зернового сусла или мелассы в анаэробных условиях в присутствии таких стимуляторов роста, как солодовые ростки или плесневые отруби; pH при брожении поддерживается на уровне 5,0; выход бутилен-гликоля указывается в 40—45%, в бражке содержится также этиловый спирт и молочная кислота.

В статье Чернова (1943) приводятся данные о работе большого опытного завода (г. Лауренсбург), работающего на зерне как исходном сырье, с производительностью 1 836 кг бутилен-гликоля или 1 002 кг бутадиена за трехдневный срок работы.

В работе Collaham (1944) подробно описывается полузаводский процесс получения 2,3-бутилен-гликоля, а из него — бутадиена при помощи культуры Aerobacter aerogenes (штамм 766), организованный на зерне, как исходном сырье, при Северной научно-исследовательской районной лаборатории. Автор одновременно приводит некоторые цифровые данные относительно проектирования большого завода по производству бутилен-гликоля и бутадиена мощностью в 10 000 т бутадиена в год.

Представляет определенный интерес также работа Ward, Pettijohn, Coghill (1945), посвященная образованию 2,3-бутилен-гликоля при сбраживании кислотных гидролизатов крахмала.

Брожение крахмальных гидролизатов с помощью культуры Aerobacter aerogenes (штамм 199) проводилось во вращающихся алюминиевых барабанах, содержащих 3 л среды следующего состава (на литр): $MgSO_4$ — 0,25 г, K_2HPO_4 — 0,6 г, мочевина — 2,0 г (прибавлялась отдельно), $CaCO_3$ — 5—10 г, крахмал — около 100 г. Гидролиз крахмала проводился при 1,5 атм. давления (128—131°) в течение 4 часов, для гидролиза применялась соляная или серная кислота 0,02—0,12 *N* концентрации; перед гидролизом крахмальная среда с внесенной в нее кислотой клейстеризовалась с целью уменьшения наблюдающейся при стерилизации пенообразования и более полного осахаривания. После внесения 8—20-часовой маточной культуры в количестве 100 мл на 3 л среды во вращающиеся барабаны подавался воздух (50—100 мл в минуту) и брожение продолжалось 20—50 часов при температуре 30°.

В работе изучались такие факторы, как: аэрация, влияние ростовых веществ, влияние различных металлических ионов (Cu, Fe и др.), влияние обработки гидролизатов различными землями (Zeo — Carb H, Darco 9—60). Средний выход бутилен-гликоля из 100 кг зерна составлял 23,5 кг, т. е. около 40%.

Freeman и Morrison (1947) подвергли сравнительному сбраживанию с помощью адаптированной культуры Aerobacter aerogenes шесть различных сортов мелассы. В разбавленную мелассу (содержащую 10—11% сахара) вносились: K_2HPO_4 — 0,25%, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,4%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01%, NaCl — 0,05%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,001% и мел — 1,2%; соли, мел и меласса стерилизовались отдельно и соединялись лишь перед инокуляцией, начальное pH среды составляло 6,5—7,0, брожение проводилось при 35°, при аэрации в течение 25—30 часов; выход бутилен-гликоля составлял 36—39% от сброженного сахара. Когда при брожении с аэрацией уменьшение сахара в среде достигало одного и ниже процента, наблюдалось значительное образование ацетоина. Выделение бутилен-гликоля из бражки проводилось путем алкогольно-известковой экстракции. При сбраживании меласс высокого качества этим методом удалось выделить из бражки до 97% бутилен-гликоля, при сбраживании меласс низкого качества — до 93%.

В этот же период (1941—1946 гг.), главным образом канадскими исследователями, проводилось интенсивное изучение другой образующей бутилен-гликоль бактерии — именно Aerobacillus polymyxa. Эта бактерия в отличие от Aerobacter aerogenes содержит амилазу и сбраживает крахмалсодержащие среды без предварительного гидролиза.

Образующийся бутилен-гликоль является l-изомером, крайне ценным в производстве антифризов, и поэтому изучение данного брожения представляло определенный практический интерес.

В указанный период по брожению с Aerobacillus polymyxa появляется большое количество новых исследований.

Работы Katznelson (1944a, 1944b) посвящены изучению сбраживания бактерий Aerobacillus polymyxa зерновых сусел. Из 28 культур, выделенных им из различных природных источников, 10 культур дали выход гликоля порядка 3,0—3,5 г на 100 мл (из 4,53 г, теоретически возможных). Брожение проводилось на 15% зерновом сусле в присут-

ствии дрожжевого экстракта. При изучении действия бактериофага в 10% пшеничное сусло, содержащее 1% углекислого кальция, вносилась хорошо удобренная огородная почва в качестве источника фага. После выращивания в течение 48 часов материал фильтровался, pH фильтрата приводился к 6,5 и затем производилось фильтрование через фильтр Зейтца; при действии полученной жидкости на выросшие в чашках Петри колонии бактерий наблюдался полный лизис последних.

В работе установлено, что бактериофаг очень чувствителен к теплу — нагревание в течение 30 минут при 55° инактивирует его; однако некоторые фаги остаются активными и при 80°. Автор указывает, что отдельные культуры Aerobacillus polymyxa являются вполне устойчивыми к бактериофагу, образуя нормальные выходы бутилен-гликоля даже в присутствии последнего.

Обширная работа Ledingham, Adams, Stanier (1945) состоит из нескольких разделов. В ней подробно описаны методы изолирования Aerobacillus polymyxa из различных природных источников. Выделено более 100 различных культур, дана подробная морфологическая и биохимическая характеристика наиболее активных из них, описан метод брожения на 15% пшеничном сусле и методика анализа получаемых продуктов. Обширный раздел посвящен изучению роли различных факторов в вопросе достижения максимальных выходов бутилен-гликоля. К числу таковых относятся: 1) природная сбраживающая способность различных культур, 2) приготовление активной маточной культуры, 3) приготовление затора, являющегося лучшим источником сбраживаемых углеводов и питательных веществ (эффект размола, варки сусла, концентрация такового), 4) влияние pH среды, 5) влияние ростовых веществ, 6) влияние температуры и, наконец, 7) влияние аэробных и анаэробных условий на брожение.

В другой серии работ по брожению с Aerobacillus polymyxa исследовалось влияние на брожение pH среды, аэрации, фильтруемости бражки, различных ростовых веществ, отношения поверхности бражки к объему таковой; установлен также углеводный баланс брожения с Aerobacillus polymyxa на глюкозе, ксилозе, пировиноградной кислоте и маннite. Продукт брожения, получаемый с Aerobacillus polymyxa, идентрифицируется как чистый *l*-изомер 2,3-бутилен-гликоля с удельным вращением — 13,34°. Rose и King (1945) описывают полузаводский процесс получения гликоля при сбраживании пшеничного сусла с Aerobacillus polymyxa (штамм C42). Ledingham, Adams (1946) публикует патент на получение 2,3-бутилен-гликоля с указанной бактерией: сусло, приготовленное из целого пшеничного, кукурузного или ячменного зерна, инокулируется активной маточной культурой, брожение ведется при 30—35°.

Однако получение 2,3-бутилен-гликоля с помощью Aerobacillus polymyxa в производственных условиях осложнялось тем обстоятельством, что выход бутилен-гликоля при применении названной бактерии был на 40% меньше, чем при брожении с Aerobacter aerogenes. Дополнительное же образование спирта в данном брожении не имеет особых преимуществ, так как спирт может быть легко получен путем обычного спиртового брожения.

В последнее время внимание, главным образом канадских исследователей, привлекает новый вид брожения — бутилен-гликоль-глицериновое, продуцируемое некоторыми культурами Bacillus subtilis. Эта бактерия, так же как и Aerobacillus polymyxa, содержит амилазу и сбраживает разнообразные крахмальные среды.

Так, Neisch, Blackwood, Ledingham (1945) при выращивании Bacillus subtilis (культура Ford) на 3% растворе глюкозы при 30° в анаэробных условиях получили на каждые 100 молей сброженной глюкозы 57 молей 2,3-бутилен-гликоля, 40 молей глицерина, 20 молей молочной

кислоты, 13 молей этилового спирта и 5 молей муравьиной кислоты.

Дальнейшие исследования указанных авторов показали, что брожение с Bacillus subtilis является крайне сложным и в зависимости от применяемой культуры, состава среды и условий брожения соотношение указанных выше продуктов может в сильной степени изменяться; так, например, образованию бутилен-гликоля и ацетоина благоприятствуют присутствие кислорода, низкие значения pH и следы тиамина в среде, образованию же глицерина — прежде всего анаэробные условия.

При наиболее благоприятных условиях расщепление молекулы глюкозы под влиянием Bacillus subtilis протекает по следующему пути:

$$3C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3 - CHOH - CHOH - CH_3 + 2CH_2OH - CHOH - CH_2OH + 4CO_2.$$

Бутилен-гликоль и глицерин образуются при этом в эквимолекулярном соотношении. Как видно, данное брожение отличается от известного брожения с Aerobacter aerogenes также отсутствием выделения молекулярного водорода, который, видимо, здесь идет на восстановление молекулы триозы до глицерина.

В дальнейшем Blackwood, Neisch, Brown, Ledingham (1947) в поисках наиболее активных культур Bacillus subtilis выделили и идентифицировали до 170 различных культур указанной бактерии, проведя с многими из них кропотливую работу по определению баланса углерода. Было установлено, что штамм Marburg и Ford культуры Bacillus subtilis в аэробных условиях быстро сбраживает глюкозу, образуя бутилен-гликоль, ацетоин, углекислый газ — как главные продукты и глицерин, уксусную, муравьиную, молочную, масляную кислоты — как побочные продукты брожения. В анаэробных условиях культура Marburg глюкозу не сбраживает совсем, культура же Ford разлагает ее так же быстро, как и в аэробных условиях, причем одни культуры образуют при этом в качестве главных продуктов глицерин и бутилен-гликоль, другие — главным образом молочную кислоту.

Авторам удалось некоторыми культурами типа Ford сбродить глюкозу на 86%, получив при этом глицерин и 2,3-бутилен-гликоль в эквимолекулярных количествах.

На основании этого ими делается предположение о возможности получения глицерина по этому пути, могущему быть в будущем более эффективным, чем современный метод получения глицерина с помощью сульфитного или щелочного процесса при спиртовом брожении.

В СССР в годы войны вопрос о получении бутилен-гликоля брожением получил свое дальнейшее развитие.

В 1943 г. Левитов и Вышепан получали 2,3-бутилен-гликоль, сбраживая с помощью культуры Aerobacter aerogenes различные углеводные среды (глюкоза, картофельные гидролизаты, свекловичный сок, древесные гидролизаты), содержащие 1,5—4% исходного сахара; концентрация бутилен-гликоля за 8—17 суток брожения достигала при этом 0,35—1,6 г в 100 мл бражки; авторам удалось выделить несколько граммов чистого бутилен-гликоля с температурой кипения 178—180°.

С 1944 г. бутилен-гликолевое брожение изучалось под руководством Первозванского во Всесоюзном научно-исследовательском институте спиртовой промышленности.

В начальный период работы (Первозванский, Чельцова, Дудыкина, Родзевич, Сегаль, 1944) основное внимание было сосредоточено на получении с помощью культуры Aerobacter aerogenes (культура № 1) чистого препарата 2,3-бутилен-гликоля в количестве, достаточном для изучения путей его превращения в бутадиен.

С этой целью были поставлены предварительные опыты по сбраживанию при 30° синтетических сред с глюкозой, картофельных гидроли-

затов (осахаренных солодом), мелассы; исходная концентрация сахара в них изменялась в пределах 3—7%; брожение продолжалось в течение 3—8 суток, бутилен-гликоля образовалось при этом от 0,7 до 1,3 г на 100 мл среды, что составляло выход в 25—30% от сброженного сахара. Получение бутилен-гликоля в больших количествах проводилось на разбавленном растворе мелассы, помещенном в объеме 15 л в металлический сосуд с кольцеобразным барбатером внутри (для продувания воздуха); применявшиеся при этом 3—7% концентрации сахарозы сбраживались при 30—40° в течение $1^1/_2$—3 суток; бутилен-гликоля образовывалось от 0,7 до 2,0 г на 100 мл бражки, что составляло выход в 25—30% от сброженного сахара. Выделение бутилен-гликоля проводилось путем перегонки на специально сконструированном лабораторном приборе, с последующим сгущением полученной флегмы в вакууме и вакуумной разгонкой сиропа. Получено 1 050 г чистого препарата 2,3-бутилен-гликоля со следующими показателями (по идентификации): температура кипения — 176—178°; удельное вращение +0,64°, показатель преломления — 1,436, содержание безводного гликоля — 90—94%.

На протяжении 1945—1946 гг. вопрос получения бутилен-гликоля брожением подвергался дальнейшей разработке, с одной стороны, в направлении изучения условий интенсификации процесса (Дудыкина, 1947), с другой,— в направлении исследования различных способов выделения 2,3-бутилен-гликоля из сброженной жидкости (Чельцова, 1947). В результате был разработан метод периодического брожения с непрерывной аэрацией, позволивший в течение 1,5—2 суток сбраживать высокие — до 15% концентрации сахара и получать до 58 г гликоля в литре бражки, что соответствовало выходу в 38—39% от сброженного сахара; в смеси с ацетоином выход достигал 40—45%, т. е. 80—90% от теоретически возможного выхода.

При применении метода доливного брожения удалось повысить концентрации сбраживаемого сахара до 18—20% и получить бутилен-гликоль в количестве до 70 г с лишним на 1 л бражки; в смеси с ацетоином выход достигал 70—80 г на 1 литр.

2. Химизм образования 2,3-бутилен-гликоля

Современный уровень наших знаний о химизме диссимиляции сахара в микробной клетке говорит о том, что первые этапы этого процесса одинаковы для всех микробных брожений и до стадии образования пировиноградной кислоты повторяют собой пути распада сахара при спиртовом брожении. Поэтому при изучении химизма бутилен-гликолевого брожения основное внимание немногочисленных исследователей было обращено на специфическую стадию этого распада — именно на механизм образования из пировиноградной кислоты (или ацетальдегида) 4 углеродных цепочек ацетоина и 2,3-бутилен-гликоля.

Некоторые из сравнительно ранних исследователей, как, например, Горовиц-Власова и Родионова (1933), не обнаружившие в культурах Bacillus subtilis на глюкозе ни пировиноградной кислоты, ни ацетальдегида (как промежуточных продуктов брожения), предположили, что в данном брожении бутилен-гликоль образуется в результате непосредственного расщепления молекулы сахара на соединения типа C_2 и C_4, ацетоин же является продуктом биологического окисления 2,3-бутилен-гликоля.

По известным исследованиям Нейберга с сотрудниками образование 2,3-бутилен-гликоля протекает через две стадии: ацетальдегид, образующийся при декарбоксилировании пировиноградной кислоты, под влиянием фермента карболигазы конденсируется в четырехуглеродную цепочку — ацетоин — по следующему пути:

$$1.\ CH_3 - CHO + CH_3 - CHO \rightarrow CH_3 - CHOH - CO - CH_3,$$

выделяющийся при брожении водород немедленно восстанавливает образующийся ацетоин до 2,3-бутилен-гликоля;

$$2.\ CH_3 - CHOH - CO - CH_3 + H_2 \rightarrow CH_3 - CHOH - CHOH - CH_3.$$

В работах Кузина с сотрудниками (1940) присутствие карболигазы с достаточной убедительностью доказано в дрожжевых (1937), растительных (Степанов, Кузин, 1931) и животных (Степанов, Кузин, 1934) клетках.

Herman и Neuschul (1932), наблюдавшие добавочное образование ацетоина при внесении пировиноградной кислоты в бродящую под влиянием культуры Aerobacter aerogenes глюкозную среду, делают вывод о промежуточной роли пировиноградной кислоты в процессе бутилен-гликолевого брожения.

Stahly и Werkman (1942) указывают, что при внесении ацетальдегида в культуру Aerobacillus polymyxa, выращиваемую на глюкозе, выход ацетоина и 2,3-бутилен-гликоля соответственно повышается.

Однако Barrit (1937) при выращивании Aerobacter aerogenes Escherichia coli на пептонной воде, содержащей различные количества ацетальдегида, ни в одном из случаев не обнаружил образования ацетоина, хотя наблюдал хорошее развитие бактерий.

Dirscherl (1931) в обширной статье полемизирует с Нейбергом, высказывая сомнение относительно участия карболигазы в образовании ацетоина и настаивая на неферментативном характере этого процесса.

На основании данных литературы последних лет [Иерусалимский (1947) и др.] начинает складываться мнение, что роль карболигазы в бутилен-гликолевом брожении выполняет одна из многочисленных, известных теперь карбоксилаз, имеющих одну и ту же активную группу — тиамин-фосфат, но разные коллоидные носители. Характерным для всех этих энзимов является их декарбоксилирующее действие на кетокислоты; способность же действовать лишь на определенные кетокислоты, образуя при этом или свободные альдегиды, или продукты их конденсации, или, наконец, кислоты, значительно разнит эти энзимы друг от друга.

В работе Sielverman и Werkman (1941), исследующих пути образования ацетоина при бутилен-гликолевом брожении, не было найдено доказательства существования двух самостоятельных энзимов: карболигазы и карбоксилазы. В присутствии клеточного сока, выделенного авторами из клеток Aerobacter aerogenes, пировиноградная кислота количественно превращалась в ацетоин и углекислый газ по уравнению:

$$2CH_3 - CO - COOH \rightarrow CH_3 - CO - CHOH - CH_3 + 2CO_2;$$

опыты проводились в приборе Варбурга; добавочное внесение ацетальдегида не увеличивало выхода ацетоина, и ацетальдегид количественно мог быть выделен обратно. Также при действии ингибиторов карболигазы (например, нагревание до 50°, действие хлороформа) не удалось наблюдать торможение в образовании ацетоина с одновременным накоплением ацетальдегида и углекислого газа, так как оказалось, что все инактиваторы образования ацетоина тормозили одновременно и выделение углекислоты. Разрушение ацетоиновой энзимной системы влекло также за собой обычно и прекращение образования углекислого газа.

Таким образом, отсутствие у клеточного сока способности использовать ацетальдегид, а также невозможность отделить декарбоксилирование от образования ацетоина являются, по мнению авторов, прямым доводом против существования карболигазы в нейберговском смысле.

По их предположению, в образовании ацетоина участвует специфического строения карбоксилаза, ответственная за ацетоиновую стадию процесса.

В обычном брожении с Aerobacter aerogenes участвует как ацетоиновая система, так и имеющийся в клетках гидрокластический энзим [1], под влиянием которого пировиноградная кислота расщепляется на муравьиную и уксусную кислоты:

$$CH_3 — CO — COOH + HOH \rightarrow CH_3 — COOH + HCOOH.$$

Гидрокластический энзим является наиболее активным при высоких значениях pH (8,0), в то время как для ацетоиновой системы оптимальными являются более низкие значения pH (5,6—6,5) и, следовательно, в происходящем в живой клетке соревновании обоих энзимов за пировиноградную кислоту реакция среды играет направляющую роль.

Как видно из изложенного, механизму распада сахара при бутилен-гликолевом брожении посвящена небольшая, состоящая из отрывочных и противоречивых данных, литература. Вопрос этот требует своего дальнейшего углубленного изучения.

3. Выделение 2,3-бутилен-гликоля и его техническое применение

Производственное выделение 2,3-бутилен-гликоля из сброженной жидкости представляет собой ряд трудностей, обусловленных как высокой температурой кипения 2,3—бутилен-гликоля (178—182°), так и присутствием в бражке значительных количеств сухих веществ (до 8%, например, в зерновом сусле).

На протяжении последних лет в связи с промышленным освоением бактериального метода получения 2,3-бутилен-гликоля был подвергнут изучению ряд способов выделения гликоля из бражки, основанных или на принципе экстрагирования, или на принципе перегонки.

Из них можно указать на способ выделения гликоля путем экстракции различными растворителями, выделение путем распылительной сушки в вакуум-камере, выделение с помощью керосиновой дестилляции, с помощью пара, подающегося под давлением, и др.

Совсем недавно Senkus Myrray (1946) осуществил принципиально новый подход к выделению бутилен-гликоля, переводя последний в легколетучее соединение — формаль, образующийся при обработке формалином водных растворов бутилен-гликоля. Этот формаль отгоняется из смеси при температуре 97—102° в виде не смешивающегося с водой масла, сразу отделяемого в декантере. Выход бутилен-гликоля в виде формаля почти количественный (98—100% от теории); при обработке формаля метиловым спиртом (в присутствии соляной кислоты) регенерируется чистый бутилен-гликоль с выходом до 94% от теории.

Согласно указанным выше исследованиям Freeman и Morrison (1947), бутилен-гликоль может быть выделен из сгущенной бражки путем известково-алкогольной экстракции.

Область технического применения 2,3-бутилен-гликоля определяется принадлежностью его к классу многоатомных спиртов и, в частности, его близостью в физическом и химическом отношении к этилен-гликолю и глицерину. Так, бутилен-гликоль может быть применен как заменитель глицерина в фармации, как увлажняющее и смягчающее средство для текстильных волокон, бумаги, казеина, желатины и клея, как растворитель некоторых красок, гумми, эфирных масел. *l*-изомер 2,3-бутилен-гликоля служит заменителем этилен-гликоля при изготовлении

[1] При приготовлении клеточного сока гидрокластический энзим в значительной степени теряется.

антифризов (Ward и сотрудники, 1942), а также может являться составной частью жидкого теплоносителя, входя в последний в соотношении: 60 частей гликоля и 40 частей воды (Coghill и Milner, 1942).

Из производных, 2,3-бутилен-гликоля наиболее технически важным является 1,3-бутадиен ($CH_2 = CH - CH = CH_2$), образующийся при полной каталитической дегидратации гликоля и являющийся, как известно, сырьем для синтетического каучука. Schniepp и сотрудники (1945) описали полузаводский метод получения бутадиена пиролизом бутилен-гликоль-диацетата.

Кетопроизводные бутилен-гликоля, как ацетоин ($CH_3 - CO - CHOH - CH_3$) и диацетил ($CH_3 - CO - CO - CH_3$), применяются в маргариновой промышленности для придания маргарину аромата натурального сливочного масла, в производстве табака для облагораживания аромата табачных изделий. Метил-этилкетон ($CH_3 - CO - CH_2 - CH_3$) является превосходным растворителем виниловых и глипталевых смол и лаков; ввиду меньшей огнеопасности (температура кипения 80°) он может служить заменителем ацетона (температура кипения 56°) в ряде химических производств, а также является исходным продуктом для получения поливинилкетонов — пластических материалов с высокими техническими качествами.

Для промышленности синтетической химии, фармацевтической, промышленности пластических смол, растворителей и др. представляют большой интерес такие производные бутилен-гликоля, как эфиры (простые и сложные), нитропроизводные, галоидопроизводные, группа окисей (например, тетраметилдиоксан) и др.

В заключение этого краткого обзора необходимо подчеркнуть настоятельную необходимость дальнейшего изучения этого нового вида брожения как в направлении чисто теоретическом — главным образом в изучении путей обмена углеводов в микробной клетке у различных видов бактерий, образующих бутилен-гликоль,— так и в чисто практическом направлении — именно в освоении наиболее рационального способа производственного получения 2,3-бутилен-гликоля.

Всесоюзный научно-исследовательский
институт спиртовой промышленности
Москва

Получено 12.VI.1948

ЛИТЕРАТУРА

1. Горовиц-Власова Л. и Родионова Е. Die Acetoingährung. Ctbl. Bakt., **87**, 333. 1933
2. Дудыкина Н. В. Получение 2,3-бутилен-гликоля брожением. Диссертация. АН БССР, Минск, 1947.
3. Дудыкина Н. В. и Первозванский В. В. Получение 2,3-бутилен-гликоля брожением. Тр. Акад. Наук БССР, 1947 (в печати).
4. Иерусалимский Н. Д. Новые данные по ростовым веществам микробов. Микробиология, XVI, 258, 1947.
5. Кузин А. и Будницкая Е. О синтезе углеродной цепи при помощи энзимов. Сообщ. VIII. Еще раз о существовании карболигазы. Биохимия, **5**, 309. 1940
6. Кузин А. О синтезе углеродной цепи при помощи энзимов. Сообщ. VII. К вопросу о существовании карболигазы. Биохимия, **2**, 70, 1937.
7. Левитов М. и Вышепан Е. Л. Получение 2,3-бутилен-гликоля путем брожения. Сб. работ Научно-иссл. ин-та пищевой промышленности БССР, стр. 40, 1941.
8. Первозванский В., Чельцова Ю., Дудыкина Н., Радзевич В., и Сегаль Р. Б. Получение 2,3-бутилен-гликоля брожением. Отчет Всесоюзного научно-иссл. ин-та спиртовой пром. 1947.
9. Первозванский В. В. и Шапиро Л. М. Получение 2,3 бутилен-гликоля путем брожения. Сб. научно-иссл. ин-та пищев. пром. БССР, стр. 49, 1941.
10. Степанов А. и Кузин А. Ueber die Synthese einer Kohlenstoffkette mit Hilfe von Enzyme. III. Ber. Chem. Ges., **64**, 1345, 1931.
11. Степанов А. и Кузин А. Ueber die Synthese einer Kohlenstoffkette mit Hilfe von Enzyme. V. Ber. Chem. Ges., **67**, 721, 1934.
12. Степанов А. и Кузин А. Ueber die Synthese einer Kohlenstoffkette mit Hilfe von Enzyme. Ber. Chem. Ges., **67**, 723, 1934.

13. Чельцова Ю. С. О выделении бутилен-гликоля из сброженной жидкости. Отчет Всесоюзного научно-иссл. ин-та спиртовой пром., 1947.
14. Чернов Н. Разработка нового метода синтеза бутадиена. Америк. техника и промышленность, 20, № 11, 696, 1943.
15. Barrit M. M. The origine of acetylmethylcarbinol inbacterial fermentation. J. Pat. Bact., 44, 679, 1937.
16. Blackwood A. C., Neish A. C., Brown W. E. and Ledingham G. A. Production and properties of 2,3-butanediol, XVII, Fermentation of glucose by Bacillus subtilis. Canad. J. Res., 25, 56, sec. B, 1947.
17. Christensen Leo; Increasing of yield of 2,3-butylene-glycol (to National Agr Co.) Pat. U. S. 2, 344, 025, March 14, 1944a.
18. Christensen Leo. Butylene-glycol, U. S. 2, 212, Sept. 12, 1944b.
19. Coghill R. and Milner R. A liquid heat transfer composition. U. S. Pat. 2369435, Sept., 1942.
20. Collaham J. R. Butylene-glycol postwar chemical or new source for butadiene Metall. and Eng. Novem. 1944.
21. Dirscherl W. Nichtfermentative Acetonbildung und das Problem der Carboligase. Z. phys. Chem., 201, 47, 1931.
22. Freeman G., Morrison R. Production of 2,3-butylene-glycol by fermentation of molasses. J. Soc. Chem. Ind., 66, 216, 1947.
23. Fulmer E., Christensen L. and Kendall A. Production of 2,3-butylene-glycol by fermentation. Ind. Eng. Chem., 25, 789, 1933.
24. Harden A. and Walpole G. Chemical action of Bact. lactis aerogenes (Escherich) on glucose and mannitol: production of 2,3-butylene-glycol and acetylmethylcarbinol from various substances. Proc. Roy. Soc., B. 77, 399, 1906.
25. Harden A. and Norris D. The bacterial production of acetylmethylcarbinol and 2,3-butylene-glycol from various substances. II Proc. Roy. Soc., B. 85, 73, 1912.
26. Hermann S. and Neuschul K. Milchsäure und Brenztraubensäure Abbau durch Essigbakterien, Biochem. Z., 246, 446, 1932.
27. Katznelson H. Studies with Bacillus polymyxa. I. Some factors affecting fermentation of wheat by Bacillus polymyxa. Can. J. Res., 22, 235, 1944a.
28. Katznelson H. Bacteriophage of Bacillus polymyxa in relation to the 2,3-butylene-glycol fermentation. Can. J. Res., 22, 241, 1944b.
29. Kendall A. Production of 2,3-butylene-glycol in fermentation. Jowa State Coll J. Sci., 9, 171, 1934.
30. Kluyver A. and Scheffer M. 2,3-butylene-glycol fermentation of carbohydrates. U. S. Pat. 888156, Febr. 1933.
31. Ledingham G., Adams G. and Stanier R. Production and properties of 2,3-butylene-glycol. I. Fermentation of wheat mashes by Aerobacillus polymyxa. Can. J. Res., 23, 48, 1945.
32. Ledingham G. and Adams G. Butylene-glycol. Can. Pat., 435, 716, July. 1946
33. Lemoigne M. Fermentation sucre par le Bacillus subtilis production de 2,3-butylene-glycol. C. R., 155, 792, 1912.
34. Lemoigne M. Fermentation butylene-glycolique du glucose par certain bacteries du grouppe Bacillus Proteus. C. R. Soc. Biol., 88, 467, 1923.
35. Neish A., Blackwood A. and Ledingham G. Dissimilation of glucose by Bacillus subtilis. (Ford's strain). Can. J. Res., 23, sec. B, 290, 1945.
36. Perlman D. Production of 2,3-butylene glycol from wood hydrolizates. Ind. Eng Chem., 36, 803, 1944.
37. Rose D. and King W. Small-scale production of 2,3-butanediol. Can. J. Res., 23, 79, 1945.
38. Schniepp L., Dunning J. and Lathrop E. Continous process acetylation of 2,3-butylene-glycol. Ind. Eng. Chem., 37, 872, 1945.
39. Stenkus Murray. Recovery of 2,3-butanediol produced by fermentation. Ind. Eng. Chem., 38, 913, 1946.
40. Sielverman M. and Werkman C. The formation of acetylmethylcarbinol from pyruvic acid by a bacterial enzyme preparation. J. Biol. Chem., 138, 35, 1941.
41. Stahly G. and Werkman C. Origin and relationship of acetylmethylcarbinol to 2,3-butylene-glycol in bacterial fermentations. Biochem. J., 36, 575, 1942.
42. Torres P and Flias A. Met. assoc. technical Cuba 18, 303, 1944 (цитир. по Chem. Abst. A. № 21, 1945).
43 Verhave Th. Herstellung von 2,3-Butylen-glycol durch Gärung. Fr. Pat. 676875 (цитир. по Ch. Z. I, 3367, 1930).
44. Ward G., Wickerham Z., Pettijohn O. and Lockwood L. Levo 2,3-butylene-glycol as an antifreez. U. S. Pat. 2, 359 950. Sept. 1942.
45. Ward G., Pettijohn G. and Coghill R. Production of 2,3-butanediol from acid-hydrolized starch. Ind. Eng. Chem., 37, 1189, 1945.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Талалаев Е. В. **О токсичности нитритов в культурах плесневых грибов.** Труды Иркутского государственного университета. Серия биологическая, т. III, вып. IV. стр. 11—18, 1948, Иркутск.

Изучалось влияние нитритов на Gladosporium herbarum в аммиачной и пептонной средах, вносимых как в момент заражения среды конидиями, так и позднее — под уже образовавшуюся мицелиальную пленку.

На основании экспериментальных данных автор выяснил, что токсическое действие нитритов независимо от характера среды (аммиачная или пептонная) лежит в зоне от 0,05% до 2%, тогда как концентрация от 0,02% и ниже (до 0,0005%) никакого токсического действия не оказывает.

Одновременно автор установил, что токсическое действие нитритов выявляется только при кислой реакции среды, так как разрушающаяся азотистая кислота дает ядовитые окислы азота. Если в кислую среду добавить мел, который нейтрализует образующиеся кислоты, то развитие гриба не приостанавливается.

А. Фатеев

Поливанный В. И. **Брожение с подвижной насадкой.** Гидролизная промышленность СССР, № 5, стр. 24, 1948.

Автор сообщает, что научные сотрудники ВНИИГС Колюжный М. и Карасик Е. исследовали отношение дрожжей к целлюлозе при сбраживании сахаров сульфитных щелоков. Ими было замечено, что при наличии целлюлозы (как неизбежно сопутствующего продукта) в сбраживаемом сусле постоянно удерживается высокая концентрация дрожжей в бродящей жидкости, что создает более высокий и ускоренный выход спирта. При полном удалении целлюлозы из бродящей жидкости сбраживание сахаров ухудшается и увеличивается недоброд.

Целлюлоза, по мнению исследователей, играет в данном случае чисто механическую роль (насадка), т. е. дрожжевые клетки в огромном количестве прикрепляются к целлюлозным волокнам и тем увеличивают поверхность соприкосновения с бродящей жидкостью.

По мнению автора, применение целлюлозной «насадки» в технике брожения представляет практический интерес.

А. Фатеев

Талалаев Е. В. и Талалаева А. М. **О биотической активности почв.** Труды Иркутского государственного университета. Серия биологическая, т. III, в. I, 1948 г., Иркутск.

Авторы пытаются объяснить стимулирующее действие различных типов почв (так называемая биотическая активность) на микроорганизмы и связать биотическую активность с почвообразовательными процессами. Ими было изучено влияние водных вытяжек подзолистых, слабоподзоленных, болотных и черноземных почв на развитие Asp. niger при 30°.

Показателем биотической активности почвы служит прирост веса мицелия гриба на специальной жидкой среде с добавлением почвенной вытяжки. Контролем служила та же среда, но без почвенной вытяжки.

Полученные экспериментальные данные пока дают частичное решение вопроса. Оказалось, что подзолистые и слабоподзоленные почвы биотически более активны, чем черноземные и болотные. Биотическая активность почв ставится авторами в зависимость от содержания гумуса — чем выше его содержание в почве, тем активность почв ниже.

А. Фатеев

Anderson R. E. **The growth requirements of luminous bacteria at various temperatures.** (Потребность роста светящихся бактерий при различных температурах). J. of Cell. and Comp. Physiol., v. 32, No 1, pp. 97—100, 1948.

Отмечено, что Achromobacter fisheri при температуре выше 26—27° не развивается на минеральной среде с глицерином, обычно употребляемой для культивирования этих бактерий.

Добавление к этой среде гидролизата казеина способствовало нормальному развитию и свечению культуры при более высоких температурах.

С целью выяснения природы тех компонентов гидролизата казеина, которые необходимы для нормального роста и свечения бактерий при высоких температурах, были испытаны аргинин, глютамин, метионин, аспарагин, серин.

Хотя каждое из этих соединений способствовало росту Achromobacter fisheri при более высоких температурах, но как развитие, так и свечение были более слабыми, чем на гидролизате казеина. Поэтому были приготовлены смеси разных аминокислот. Оказалось, что смесь 0,04 мг метионина, 0,04 мг глютатиона, 0,01 мг аспарагина и 0,01 мг аргинина, подобно гидролизату казеина, вызывает пышный рост и свечение Achromobacter fisheri при высоких температурах.

Л. Осницкая

Manten A. **Phototaxis in the purple bacterium Rhodospirillum rubrum and the relation between phototaxis and photosynthesis.** (Фототаксис у пурпурной бактерии Rhodospirillum rubrum и отношение между фототаксисом и фотосинтезом). Antonie van Leeuwenhoek. J. of Microb. and Serology, v. 14, No. 2, pp. 65—87, 1948.

Неоднократно при микроскопировании наблюдалось скопление пурпурных бактерий в освещенной с большей интенсивностью части поля. Это явление объясняли способностью пурпурных бактерий к фототаксическим реакциям, но природа фототаксиса и связь его с фотосинтезом не были установлены.

Опыты проводились с культурой Rhodospirillum rubrum, выращенной в анаэробных условиях на свету при 25—30° в жидкой среде, с 1% пептона и $^1/_2$% NaCl, и сохранившей способность к фототаксису в различных условиях.

Определение спектров поглощения производилось в бактериофотометре, сконструированном так, чтобы можно было освещать одновременно 2 поля зрения светом разной интенсивности и различного состава спектра.

Выделение и разделение пигментов производились с помощью различных растворителей и последующим хроматографированием в колонке Brockman с окисью алюминия.

Изучение спектров пигментной системы в целом и отдельных пигментов сравнительно с спектрами культур показало, что существует корреляция между фототаксисом и фотосинтезом: пигмент, в основном участвующий в фотосинтезе, принимает участие и в процессе фототаксиса и каротиноиды также принимают участие в фотосинтезе.

Автор предполагает, что фототаксис у пурпурных бактерий вызывается внезапным уменьшением скорости фотосинтеза.

Л. Осницкая

Fitzgerald K. J., Bernheim F. and Fitzgerald D. B. **The inhibition by Streptomycin of adaptive enzyme formation in Mycobacteria.** (Задержка стрептомицином образования адаптивного энзима у Mycobacteria). J. of Biol. Chem., v. 175, No. 1, pp. 195—200, 1948.

Известно, что многие Mycobacteria способны окислять бензойную кислоту, а некоторые из них могут использовать ее в качестве единственного источника углерода.

При этом замечено, что в начале окисление происходит очень медленно, затем, после некоторого периода времени, бактерии начинают интенсивно окислять бензойную кислоту. Stanier установил, что задержка окислительного процесса вызывается образованием у этих бактерий адаптивного энзима — оксидазы. В более ранних исследованиях авторы данной работы показали, что добавление стрептомицина задерживает образование этого энзима и окисление бензойной кислоты не наступает.

В настоящей работе были испытаны условия, способствующие наиболее интенсивному образованию адаптивного энзима у некоторых форм Mycobacteria, и изучено действие стрептомицина на этот процесс.

Работа была проведена с двумя культурами: Mycobacterium tuberculosis BCG и Mycob. lacticola. Последняя была способна окислять как бензойную, так и *p*- и *m*-гидроксибензойную кислоты.

Постановка опытов была следующая: Mycobacterium tuberculosis BCG выращивалась в течение 72 часов на синтетической среде Long. Из клеток, отмытых дестиллированной водой, была приготовлена бактериальная суспензия в 0,05 М фосфатном буфере при pH, равном 6,7. 1 мл такой суспензии содержал 0,1 мл бактериальной массы.

Опыты были проведены в сосудах Варбурга. Испытывалось 0,5 мл бактериальной суспензии в общем объеме жидкости 2 мл.

Mycobacterium lacticola выращивалась в течение 48 часов на синтетической среде Kohn и Harris, и посев был приготовлен таким же способом.

Опыты показали, что у обычных Mycobacterium lacticola при добавлении увеличивающихся концентраций стрептомицина значительно задерживается окисление *p*-гидроксибензойной кислоты, в то время как у этих же бактерий, но предварительно выращенных в присутствии указанной кислоты, задержка окисления при тех же концентрациях стрептомицина происходит значительно меньше.

Были проведены также опыты по выявлению оптимальных концентраций бензойной кислоты, необходимых для накопления у бактерий максимального количества адаптивного энзима.

В этих исследованиях была использована Mycobacterium tuberculosis BCG как раса, наиболее чувствительная к стрептомицину. Установлено, что при выдержке бактериальной суспензии с 5 γ бензоата натрия в течение 15 минут происходит образование заметных количеств адаптивного энзима.

Применение более высоких концентраций бензоата натрия способствует более интенсивному образованию этого энзима. Однако накопление оксидазы значительно снижается при дозе бензоата натрия в 20 γ.

Авторы считают, что в данном случае фактором, лимитирующим образование адаптивного энзима, являлась недостаточная продолжительность опыта.

Аналогичные опыты, проведенные в более продолжительный период (60 минут), показали, что максимальное количество адаптивного энзима образовалось в присутствии 100 γ бензоата натрия. Критерием этого была незначительная задержка окислительного процесса стрептомицином.

Ингибиторное действие стрептомицина на бактерии не проявляется сразу. Это, вероятно, объясняется медленным проникновением яда в клетку.

Основываясь на работах Соlеп, авторы предполагают, что образование адаптивного энзима у изучаемых форм бактерий задерживается в присутствии стрептомицина вследствие соединения последнего с клеточной нуклеиновой кислотой.

Л. Логинова

Rosenfeld W. **Fatty acid transformation by anaerobic bacteria.** (Превращения жирных кислот анаэробными бактериями). Arch. of Biochem., v. 16, № 2, pp. 263—273, 1948.

Исследовалось развитие бактерий из морских отложений (смешанные культуры) в анаэробных условиях за счет жирных кислот. Всего исследовано 16 жирных кислот от муравьиной до стеариновой, в том числе несколько ненасыщенных. Кислоты употреблялись в виде калиевых солей.

Для большинства культур жирные кислоты были токсичны. Лишь 3—4 накопительные культуры из 62 исследованных развивались за счет жирных кислот. Это — культуры десульфурирующих бактерий. При исследовании ферментных систем отмытых бактерий по Тунбергу с метиленовой синью обнаружены дегидрогеназы ряда жирных кислот. Дегидрогеназы обнаружены не только у десульфурирующих, но и у недесульфурирующих анаэробов, расщепляющих жиры.

Некоторые культуры оказались способными гидрировать ненасыщенную кислоту за счет водорода муравьиной кислоты.

И. Работнова

Rabinowitz J., Mondy N. and Snell. **The vitamin B_6 group. XIII. An improved procedure for determination of pyridoxal with Lactobacillus casei.** (Группа витамина B_6. XIII. Улучшенный способ определения пиридоксаля при помощи Lactobacillus casei). J. of Biol. Chem., No. 1, pp. 147—153, 1948.

В отличие от ранее описанных методов определения пиридоксаля в присутствии остальных представителей группы витамина B_6 авторы вводят в питательную среду, помимо кислотного гидролизата казеина, также и продукт его расщепления трипсином (Robert and Snell, J. Biol. Chem., 163, 499, 1948). Наблюдающееся в результате более пышное развитие Lactobacillus casei обусловлено, по мнению авторов, присутствием «стрепогенина» и других пептидов.

Измененная основная среда (концентрации вдвое больше конечных) содержит в 100 мл: 1 000 мг триптического и 1 000 мг кислотного гидролизата казеина, 40 мг гликокола, 20 мг аспарагина, 20 мг *dl*-триптофана, 40 мг *l*-цистина, 2 000 мг глюкозы, 1 200 мг уксуснокислого натрия, 100 мг K_2HPO_4, 100 мг KH_2PO_4, 40 мг $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 мг NaCl, 2 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 мг $MnSO_4 \cdot H_2O$, 80 γ рибофлавина, 40 γ солянокислого тиамина, 80 γ кальциевой соли пантотеновой кислоты, 80 γ ниацина, 40 γ *p*-аминобензойной кислоты, 2 γ фолевой кислоты и 0,4 γ биотина. Для извлечения пиридоксаля оба малеиновых гидролизата подвергаются двухкратной обработке животным углем. Поскольку в присутствии аминокислот пиридоксаль претерпевает существенные изменения, проба и среда автоклазируются раздельно.

При принятой авторами обработке анализируемого материала (Rabin and Snell, Ann. Chem., 19, 277, 1947) аминирования пиридоксаля не происходит.

Точность метода, как показали специальные опыты, 10%.

В описанных условиях определению может помешать *d*-аланин, который обладает способностью обеспечивать рост Lactobacillus casei и в отсутствие пиридоксаля. Однако авторы думают, что это не умаляет значения метода, так как для равноценного действия *d*-аланина требуется в 10—25 тысяч раз больше, чем пиридоксаля, а между тем распространение этой аминокислоты в природе крайне ограничено.

Авторы приводят данные анализа биологических объектов на содержание пиридоксаля.

Т. Борисова и Е. Грищенко

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Gilman J. C. **A manual of soil fungi**. Ames, Iowa, 1945 (Гильман И. К. Руководство по почвенным грибам. Стр. IX + 392, Иова, США, 1945).

Это обширная компилятивная сводка, в которой собраны диагнозы всех описанных в литературе почвенных грибов и приводятся дихотомические ключи для их определения. В кратком введении (6 стр.) дается общая характеристика строения грибов и обзор признаков, лежащих в основе их классификации. Затем следует ключ для определения классов, порядков и семейств. Дальнейший материал представлен четырьмя разделами: I. Фикомицеты (135 стр.), II. Аскомицеты (23 стр.), III. Несозершенные грибы (195 стр.) и IV. Стерильные мицелии (2 стр.). Каждой из этих разделов содержит ключ для определения родов, ключи для видов каждого рода и описания этих видов. В конце каждого описания указывается автор, описавший данный гриб из почвы, и страна, откуда он был изолирован. Для каждого рода грибов имеется рисунок, всего иллюстраций — 135. Список цитированной литературы состоит из 169 названий. В распределении материала автор придерживается системы, принятой Линдау в известном руководстве Энглера и Прантля. При обработке некоторых групп были использованы специальные монографии: Циха — по Mucorales, Кукера — по Saprolegniaceae, Тома — по пенициллам и аспергиллам, Воленвебера и Рейнкинга — по фузариумам. Из замеченных нами недостатков отметим следующие. Раздел о мукохитридиевых грибах включает только два вида Rizophlyctis rosea и Nowakowakiella delica. Между тем в последние годы рядом исследователей установлено наличие в почвах многих других микохитридиевых, ведущих сапрофитное существование. К формам, изолированным из почв до выхода в свет рецензируемой монографии, относятся: Rhizidiomyces bivellatus (Набель, 1939), Rhizidiomyces apophysus (Карлинг, 1944), Rhizidiomyces Hansonnii (1944). Непонятно, почему эти виды, являющиеся типичными обитателями почв, в монографии Гильмана пропущены. Значительным ущербом для полноты материалов о всех группах почвенных грибов является также отсутствие в этом руководстве данных о почвенных дрожжах. Существенный недостаток рецензируемой работы — неиспользование автором русской литературы по почвенным грибам. Из русских авторов Гильманом использованы только некоторые публикации Райло и Шенникова. Монография эта может быть полезным пособием и справочником для занимающихся микологией почв.

Д. М. Новогрудский

ЛЮДМИЛА БОРИСОВНА СЕВЕРЦОВА

В конце 1948 г. скончалась Л. Б. Северцова, урожденная Райвич, известная микробиологам нашей страны по ряду интересных работ.

Л. Б. начала работать в 1913 г. в качестве практиканта на Бактериолого-агрономической станции (ныне Московский филиал Всесоюзного института сельскохозяйственной микробиологии), когда ее директором был С. А. Северин.

По образованию Л. Б. была зоолог и после окончания Киевского университета специализировалась у А. Н. Северцова. Интерес к своей специальности она сохранила, работая и в области микробиологии. Ею были проведены исследования микрофлоры кишечного червя в связи с выяснением условий этиологии одного из наиболее распространенных заболеваний кишечника шелковичного червя. Данный вопрос решался ею в связи с условием кормления шелковичного червя.

Позднее Л. Б. разработала оригинальный метод подсчета и выделения простейших из почвы. Данным приемом микробиологические лаборатории пользуются и по настоящее время.

Прекрасно зная иностранные языки, она перевела на английский язык многие труды А. Н. Северцова.

В 1947 г. вышла талантливо написанная монография Л. Б., посвященная жизни и деятельности академика А. Н. Северцова.

СОДЕРЖАНИЕ

Николай Федорович Гамалея (Девяносто лет со дня рождения) 97
Ц. З. Рогинская и В. И. Любимов. Литические явления в культурах Actinomyces griseus 100
В. Н. Шапошников и В. А. Семенова. О материальной зависимости процессов энергетического и конструктивного обменов веществ у бактерий 106
А. Мантейфель, В. Богданова и И. Четверикова. Взаимосвязь процессов конструктивного и энергетического обмена веществ у гетеротрофных бактерий. 1. Bact. formicum 118
Н. А. Красильников. Микробиологические факторы обрастания камней углекислым кальцием 128
М. М. Кононова. Участие целлюлозных миксобактерий в процессе гумификации растительных остатков. II. О биохимизме процесса образования гуминовых кислот 132
А. Е. Крисс и Е. А. Рукина. Микробиология Черного моря. Распространение микроорганизмов в водной толще Черного моря 141
Г. Ф. Гаузе. О правизне—левизне у Bacillus mycoides. 1. Географическое распространение и некоторые физиологические свойства правозавитых и левозавитых форм 154
М. М. Макарова. О новом пигментном кокке 160
А. Ф. Флеров и Н. Н. Коваленко. Дрожжи некоторых плодов и ягод и их круговорот в природе 163
А. В. Ромакина. Эпифитная микрофлора проса, перезимовавшего в поле 168
Е. В. Рунов. Распространенность стрептококкового бактериофага в сырах 174
Г. В. Артемьев. Передача „израстания" семенной капусты при трансплантации 177
Н. В. Дудыкина. Бутилен-гликоль и его образование в процессах брожения (Обзор) 181
Рефераты 195
Критика и библиография 198
Людмила Борисовна Северцова 199

А-02498 Подписано к печати 22/III 1949 г. Печ. л. 6½+2 вклейки
Уч.-изд. л. 9,7 Тираж 4800 экз. Заказ 2145

2-я типография Издательства Академии Наук СССР. Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 руб.